

03081

7

rej.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

U. A. C. P. y P. del C. C. H.

**EFFECTOS TISULARES Y CELULARES DE LA EXPOSICION
EXPERIMENTAL A POLVOS INORGANICOS**

TESIS

Que para obtener el Grado de:
Doctor en Investigación Biomédica Básica

Presenta
Alvaro Román Osornio Vargas

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1991

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

I.	INDICE GENERAL	<i>i</i>
II.	INDICE DE FIGURAS Y CUADROS	<i>iv</i>
III.	LISTA DE ABREVIATURAS	<i>vii</i>
IV.	INTRODUCCION	1
	Objetivos	15
V.	MATERIAL Y METODOS	19
	A) Exposición de Ratas a Polvo de Mexicali	19
	Actividad Quimiotáctica para Macrófagos Alveolares en Suero Activado por Polvo de Mexicali	23
	Determinación del Complemento en el Suero Activado por Partículas Inorgánicas	25
	Determinación de Complemento y Actividad Quimiotáctica para Macrófagos Alveolares en Lavado Bronquioalveolar Activado por Partículas Inorgánicas	25
	B) Exposición Múltiple a Asbesto	27
	C) Exposición de Eritrocitos Humanos a Asbesto Crisotilo	29

Indice

Actividad de las ATPasa de $[Na^+, K^+]$ y de $[Ca^{++}, Mg^{++}]$ en Fantasma de Eritrocitos Expuestos a Asbesto	32
Liberación de Acido Siálico por Acción de Neuraminidasa en Fantasma de Eritrocitos Expuestos a Asbesto	34
Electroforesis en Geles de Poliacrilamida-SDS de los Fantasma de Eritrocitos Expuestos a Asbesto	36
Hemólisis de Eritrocitos Expuestos a Asbesto en Presencia de Na, K o Li	37
D) Estadística	37
VI. RESULTADOS	38
A) Exposición de Ratas a Polvo de Mexicali	38
Actividad Quimiotáctica para Macrófagos Alveolares en Suero Activado por Polvo de Mexicali	44
Determinación del Complemento en el Suero Activado por Partículas Inorgánicas	47
Determinación de Complemento y Actividad Quimiotáctica para Macrófagos Alveolares en Lavado Bronquioalveolar Activado por Partículas Inorgánicas	48
B) Exposición Múltiple a Asbesto	51
C) Exposición de Eritrocitos a Asbesto	62

Indice

	Actividad de las ATPasa de [Na ⁺ , K ⁺] y de [Ca ⁺⁺ , Mg ⁺⁺] en Fantasma de Eritrocitos Expuestos a Asbesto	65
	Tratamiento con Neuraminidasa	69
	Electroforesis en Geles de Poliacrilamida-SDS de los Fantasma de Eritrocitos Expuestos a Asbesto	70
	Hemólisis de Eritrocitos Expuestos a Asbesto en Presencia de Na, K o Li	73
VII.	DISCUSION	74
	Lesiones Experimentales por Polvo de Mexicali	74
	Exposición Múltiple a Asbesto	78
	Exposición de Eritrocitos a Asbesto	83
	Conclusiones	88
VIII.	BIBLIOGRAFIA	90
IX.	AGRADECIMIENTOS	102
X.	ANEXOS	103
	Resumen	103
	Abstract	105
	Carta de Aceptación en Environmental Research	106

INDICE DE FIGURAS Y CUADROS

INTRODUCCION

- Cuadro I	Neumoconiosis	3
- Figura 1	Polvo de Mexicali	20
- Figura 2	Unidad Anatómica Pulmonar	22
- Figura 3	Asbesto Crisotilo	30

EXPOSICION AL POLVO DE MEXICALI

- Figura 4	Pulmones de Ratas Expuestas al Polvo de Mexicali (Histología)	39
- Figura 5	Pulmones de Ratas Expuestas al Polvo de Mexicali (Microscopía de Barrido)	40
- Figura 6	Depósito de Polvo de Mexicali en el Pulmón de Rata	41
- Cuadro II	Número de Partículas Depositadas en el Pulmón de Rata	41
- Figura 7	Bifurcación Ductal con Macrófagos Alveolares	42
- Figura 8	Distribución de Macrófagos Acumulados	43
- Cuadro III	Distribución y Número de Macrófagos Acumulados	44
- Figura 9	Quimiotaxis por Suero Activado con Partículas	45
- Figura 10	Quimiocinesis por Suero Activado con Partículas	46
- Cuadro IV	Quimiotaxis por Suero Inactivado	46
- Figura 11	Complemento Hemolítico en Suero Activado con Partículas	47
- Figura 12	Doble Inmunodifusión con anti-C _{3b}	48

- Figura 13	Complemento Hemolítico en Lavado Pulmonar	49
- Figura 14	Quimiotaxis en Lavado Activado con Partículas	50
- Figura 15	Inhibición de Quimiotaxis con EDTA	50

EXPOSICION MULTIPLE A ASBESTO

- Cuadro V	Distribución del Asbesto Depositado Después de Exposición Unica y Múltiple	51
- Figura 16	Depósito de Asbesto (Microscopía de Barrido)	52
- Figura 17	Distribución y Depósito de Asbesto	53
- Figura 18	Respuesta Macrofágica a la Inhalación de Asbesto	55
- Figura 19	Migración de Macrófagos al Sitio de Depósito del Asbesto (Microscopía de Barrido)	56
- Figura 20	Número de Macrófagos Acumulados	57
- Figura 21	Depósito de Fibras Después de Lavado Pulmonar	58
- Cuadro VI	Número de Fibras Depositadas Después de Lavado	58
- Figura 22	Distribución de Macrófagos Después de Lavado	59
- Cuadro VII	Macrófagos que Fagocitaron Asbesto	60
- Figura 23	Quimiotaxinas en Lavado Pulmonar	61

EXPOSICION DE ERITROCITOS A ASBESTO

- Figura 24	Hemólisis con Dosis Crecientes de Asbesto	62
- Figura 25	Microscopía de Barrido de Eritrocitos Expuestos a Asbesto	63
- Figura 26	Interacción del Asbesto con los Fantasmas de Eritrocitos (Microscopía de Transmisión)	64

Indice

- Figura 27	Método de Bradford y Asbesto	65
- Figura 28	Método de Lanzetta y Asbesto	66
- Cuadro VIII	[γ - 32]ATP y asbesto	66
- Cuadro IX	Actividad Enzimática en Presencia de Tritón X-100	67
- Figura 29	Actividad de la ATPasa [Na ⁺ , K ⁺]	68
- Figura 30	Actividad de la ATPasa [Ca ⁺⁺ , Mg ⁺⁺]	69
- Figura 31	Liberación de Acido Siálico por Neuraminidasa	70
- Figura 32	Electroforesis de las Membranas de Eritrocitos	72
- Figura 33	Hemólisis en Presencia de Na, K o Li	73

LISTA DE ABREVIATURAS

A continuación se presenta una lista de las abreviaturas **no** convencionales empleadas en el texto.

%MA/20 C:	Porcentaje de macrófagos alveolares que migraron en la quimiotaxis y que fueron observados en 20 campos a 100x.
1ª. Bif:	Primera bifurcación después del bronquiolo terminal.
2ª. Bif:	Segunda bifurcación después del bronquiolo terminal.
A:	Fibras de asbesto crisotilo.
αC:	Partículas de alfa cuarzo (sílice cristalino).
AS:	Acido siálico.
BT:	Bronquiolo terminal.
CA:	Conducto alveolar.
Fe:	Partículas de hierro carbonilo.
Grupo 3/0:	Las ratas se sacrificaron inmediatamente después de una exposición de tres horas.
Grupo 3/0a:	Las ratas fueron fijadas por vía aérea inmediatamente después de una exposición de tres horas.
Grupo 3/0v:	Las ratas fueron fijadas por vía vascular inmediatamente después de una exposición de tres horas.
Grupo 3/1:	Las ratas se sacrificaron un mes después de una exposición de tres horas.
Grupo 3/8:	Las ratas se sacrificaron ocho días después de una exposición de tres horas.
Grupo 3/24:	Las ratas se sacrificaron 24 horas después de una exposición de tres horas.

Abreviaturas

Gupo C:	Las ratas fueron expuestas a aire ambiente.
Grupo T:	Grupo de ratas expuestas durante tres horas a asbesto en tres días consecutivos.
Grupo T/0:	Las ratas fueron sacrificadas inmediatamente después de la tercera dosis de asbesto.
Grupo T/8:	Las ratas fueron sacrificadas ocho días después de la tercera dosis de asbesto.
Grupo T/24:	Las ratas fueron sacrificadas 24 horas después de la tercera dosis de asbesto.
Grupo U:	Grupo expuesto una vez a asbesto crisotilo por tres horas.
Grupo U/0:	Las ratas fueron sacrificadas inmediatamente después de una exposición de tres horas a asbesto.
Grupo U/8:	Las ratas fueron sacrificadas ocho días después de una exposición de tres horas a asbesto.
Grupo U/24:	Las ratas fueron sacrificadas 24 horas después de una exposición de tres horas a asbesto.
H y E:	Tinción histológica con hematoxilina y eosina.
LAA:	Lavado pulmonar activado con asbesto.
LAC:	Lavado pulmonar activado con alfa cuarzo.
LAPM:	Lavado pulmonar activado con polvo de Mexicali.
LAZ:	Lavado pulmonar activado con zimosán.
LBA:	Lavado bronquioalveolar o pulmonar.
LBA c/masaje:	Lavado bronquioalveolar con masaje suave.
LBA s/masaje:	Lavado bronquioalveolar por gravedad.
LN:	Lavado pulmonar normal.
MA:	Macrófagos alveolares.

Abreviaturas

MEB:	Microscopía electrónica de barrido
MER:	Microscopía de electrones retrodispersos.
MET:	Microscopía electrónica de transmisión.
ML:	Microscopía de luz.
MRx:	Microanálisis de rayos-x.
PBS:	Solución salina amortiguadora con fosfatos.
PM:	Polvo de Mexicali.
S:	Suero de rata normal.
SAA:	Suero de rata activado con asbesto.
SAαC:	Suero de rata activado con alfa cuarzo.
SAFe:	Suero de rata activado con hierro carbonilo.
SAPM:	Suero de rata activado con polvo de Mexicali.
SAZ:	Suero de rata activado con zimosán.
UCH50:	Unidades de complemento hemolítico al 50%.
Z:	Zimosán.

INTRODUCCION

El estudio experimental de los efectos tisulares y celulares inducidos por polvos inorgánicos en el pulmón representa una fase trascendental en el estudio de las enfermedades humanas producidas por la exposición ambiental a dichos polvos. Esta es un área de estudio de gran actualidad, dado el desarrollo industrial del mundo y la consiguiente contaminación ambiental.

La evaluación de los efectos tóxicos imputables a las partículas contaminantes requiere de investigaciones epidemiológicas, clínicas y experimentales (*in vitro* e *in vivo*). La gran cantidad de variables que existen en estos procesos hace difícil establecer controles estrictos para cada nivel de estudio. De todos estos los modelos experimentales sirven para corroborar de una manera más controlada las observaciones hechas en humanos, así como para proponer los mecanismos de daño y respuesta en los sistemas biológicos expuestos a contaminantes inorgánicos (1).

Si bien en un principio estas investigaciones tendieron a dar respuestas de aplicación práctica inmediata (2, 3), en la actualidad tienen como objetivo adicional el investigar problemas de trascendencia biológica como la activación, la comunicación, la transformación y la muerte celular (4, 5, 6, 7).

Se sabe que las enfermedades pulmonares relacionadas con la inhalación de polvos inorgánicos existieron desde hace siglos (8). A partir de la revolución industrial, estas enfermedades han adquirido una mayor importancia y no obstante las medidas de control existentes, siguen representando un problema de

salud que no se limita al ambiente laboral, sino que ha trascendido a la comunidad.

En 1866 Zenker introdujo el término Neumoconiosis para agrupar a los padecimientos pulmonares relacionados con la inhalación de polvos que afectaban particularmente a los mineros. Pocos años después se reconoció al cuarzo (sílice cristalino) como uno de los principales agentes productores de neumoconiosis, acuñándose el término de silicosis (9). Con el paso del tiempo se han identificado nuevos padecimientos asociados con otros contaminantes, tales como: el asbesto con la asbestosis; los silicatos no asbesto con la silicatosis; el talco con la talcosis; el asbesto con cáncer pulmonar y pleural; etc. (Cuadro I). Como ya se mencionó, estas asociaciones se han establecido por la integración de informaciones obtenidas de estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales (9, 10, 11).

Las lesiones pulmonares producidas por la inhalación de polvos inorgánicos generalmente se manifiestan después de varios años de haberse iniciado la exposición (10 - 20 años). Sus expresiones clínicas son el resultado de afección intersticial pulmonar, que en ocasiones se combina con problemas obstructivos cuando coexiste con otros contaminantes como gases o humo de cigarro (9, 10). Otra posibilidad es la producción de neoplasias pulmonares o pleurales, especialmente en el caso del asbesto y cuyo riesgo aumenta si se asocia con el tabaquismo (12, 13). En otros casos las alteraciones pulmonares son mínimas y no alteran la función respiratoria. Como se puede observar existe una gama de manifestaciones, cuyo reconocimiento temprano es difícil y cuya progresión, en la mayoría de los casos, es invalidante y letal. El reconocimiento de estas enfermedades depende en buena medida de la capacidad para identificar el antecedente de exposición a polvos y del reconocimiento del potencial tóxico de los mismos. Esto no representa problema alguno cuando la

CUADRO I

Neumoconiosis

Partículas	Enfermedad	Exposición
<u>Fibrosis y/o Cáncer</u>		
<u>Sílice cristalino</u>	Silicosis	Minería, alfarería, limpiadores con chorros de arena
<u>Asbesto</u>	Asbestosis Mesotelioma Cáncer pulmonar	Minería, aislamiento, construcción. Exposición en población abierta.
<u>Carbón</u>	Antracosis con fibrosis progresiva	Minería
<u>Silicatos:</u>		
Fibra de vidrio	Fibrosis, mesotelioma y cáncer	Industrial
Talco	Talcosis	Drogadictos, talco comercial
Tierra diatomácea Caolín	Silicatosis Silicatosis	Industrial Alfareros, Minería
Feldespatos	Silicatosis	Erupciones volcánicas, tolvaneras
Micas	Silicatosis	Minería, manufacturas, granjeros
<u>Berilio</u>	Beriliosis	Industrial

CUADRO I (Cont.)

Partículas	Enfermedad	Exposición
	<u>Máculas de polvo *</u>	
<u>Aluminio</u>	Aluminosis	Industrial
<u>Hierro</u>	Siderosis	Industrial Soldadores Minería
	Enfermedad de los mineros de la he- matita	
	Pulidores de plata	Orfebrería
<u>Titanio</u>	Pulmón de titanio	Industria
<u>Estaño</u>	Estanosis	Industrial
<u>Bario</u>	Baritosis	Minería y después de radiología contrastada

*La mayoría de estos elementos se acumulan en el pulmón en forma de máculas, sin que haya mayor alteración intersticial. No obstante se han informado casos graves de fibrosis pulmonar como: la enfermedad de los mineros de la hematita. Existen otras enfermedades por la inhalación de vapores de mercurio, cadmio, bauxita, berilio y la enfermedad de los soldadores de arco, entre otras.

identificación se realiza en ambientes laborales con contaminantes conocidos y lo que procede, es el reconocimiento temprano de la enfermedad por medio de sondeos periódicos con pruebas de función respiratoria y radiografías de tórax en la población expuesta (14, 15, 16). El diagnóstico resulta más difícil cuando nos

enfrentamos con un paciente fuera del ambiente laboral, sin antecedentes precisos de exposición o que estuvo expuesto a un contaminante con potencial patógeno desconocido.

A pesar de que la mayoría de los polvos inorgánicos tóxicos tienen como blanco de acción al intersticio pulmonar, existen diferencias importantes en el tipo y la gravedad de la lesión histológica que producen. La silicosis típica presenta lesiones nodulares fibrosas con arreglos concéntricos de las fibras de colágena, poco celulares y con distribución periférica de las partículas. Este cuadro histológico se observa en sujetos expuestos a polvos con concentración de sílice de alrededor de 30% por períodos de 20 a 40 años y en sujetos expuestos a dosis mayores por períodos más cortos (5 a 15 años). Las lesiones silicóticas pueden evolucionar a fibrosis masiva con distribución preferencialmente localizada en los lóbulos superiores. En algunos otros casos, la lesión pulmonar se desarrolla después de uno a tres años de exposiciones graves y cortas y en las que el nódulo silicótico no es la lesión característica, sino una fibrosis intersticial con depósito intralveolar de proteínas, lípidos y células (9, 17).

En el caso de la asbestosis, las lesiones pulmonares culminan en alveolitis fibrosante, después de haber pasado por un espectro de lesiones intersticiales inflamatorias (10). Una característica muy particular de esta entidad es la presencia de fibras de asbesto recubiertas con hierro y proteínas en el seno de las lesiones y que se conocen con el nombre de cuerpos ferruginosos.

En el caso de la inhalación de talco y otros silicatos no asbesto, la reacción intersticial pulmonar se caracteriza por la presencia de granulomas de cuerpo extraño, en las que es posible identificar partículas por medio de la polarización de la luz o por microanálisis de rayos-x.

En algunos otros casos de inhalación de polvos inorgánicos, su bajo potencial patógeno resulta en el depósito y retención intrapulmonar de las

partículas sin que se desarrollen lesiones significativas. Estos depósitos (intraalveolares, alrededor de las vías aéreas o de vías linfáticas), provocan opacidades radiológicas que en determinado momento pudieran sugerir la existencia de una lesión intersticial pulmonar. Tal sería el caso de la inhalación de óxido de hierro, de bario, de estaño, de titanio y de carbón. En estos casos siempre hay que considerar la participación del sílice, ya que también se libera en las actividades extractivas de dichas partículas y pudiera ser responsable de la producción de lesiones intersticiales. Por ejemplo: la fibrosis y nódulos silicóticos en la enfermedad de los mineros del carbón o en el pulmón de los mineros de la hematita (óxido de hierro y sílice).

Los datos anteriores sugieren la participación de múltiples variables en la generación, mantenimiento y progresión de las lesiones producidas por las partículas inorgánicas. Dentro de ellas podemos señalar: dosis, tiempo de exposición, tamaño y características fisicoquímicas de las partículas, depósito, retención y eliminación de las mismas; así como la susceptibilidad del individuo. Este último permanece como un campo prácticamente inexplorado hasta la fecha.

Los estudios de retención, depósito y depuración pulmonar de las partículas han originado el concepto de "fracción respirable de las partículas" (18). Este concepto ha sido aplicado en las técnicas de muestreo de aire y corresponde a aquellas partículas capaces de alcanzar la periferia de los pulmones y que tienen un diámetro aerodinámico menor a $3.5 \mu\text{m}$. Estas partículas tienden a permanecer atrapadas en el pulmón y por lo tanto representan un riesgo de producir enfermedad. Tanto los estudios en humanos con marcadores radiactivos, como los modelos matemáticos desarrollados *ex profeso* para estudiar este tema, consideran que los patrones de depósito se circunscriben a tres compartimentos:

1) nariz, 2) árbol traqueobronquial y 3) parénquima pulmonar (19). Practicamente el 100% de las partículas mayores de 10 μm son eliminadas en las vías aéreas superiores por los vellos y el aparato mucociliar.

El depósito de las partículas comprendidas en la fracción respirable obedece a cinco mecanismos: impactación por inercia, sedimentación, difusión o movimiento browniano, precipitación electrostática o intercepción (20). De éstas, la precipitación electrostática no parece desempeñar un papel muy importante. La impactación por inercia ocurre con mayor frecuencia en el nivel bronquial y el resto corresponden a mecanismos de depósito del nivel periférico.

La eliminación de las partículas del parénquima pulmonar (de bronquiolo terminal a alveolo) se debe a varios factores, la mayoría aún no bien caracterizados y que pueden dividirse en rápidos (responsables del 60% de la eliminación) y lentos (40%). El más claro de ellos corresponde a la eliminación de partículas por el macrófago alveolar (mecanismo rápido), el que participa eficientemente ante concentraciones moderadas de partículas. Cuando existen concentraciones mayores, este mecanismo alcanza una meseta dejando paso a otros posibles mecanismos, como serían: la existencia de un gradiente en el fluido alveolar que "desplace" a las partículas hacia el aparato mucociliar (20); o la migración de las partículas hacia el intersticio (21) o hacia los linfáticos (22) (todos ellos mecanismos lentos).

El conocimiento de la relación entre depósito, eliminación y retención de partículas permite establecer la posibilidad de desarrollar una lesión y de conocer su sitio anatómico de inicio. La correlación entre los resultados obtenidos con modelos matemáticos de retención de partículas y la cantidad encontrada después de la incineración de pulmones de pacientes con silicosis, resulta ser muy buena. Los cálculos matemáticos indican que en un sujeto cualquiera, la retención

pulmonar del total de partículas depositadas durante un año, sería del 9%. En el caso de exposiciones intermitentes, similares a las ocupacionales, se retendría el 1.5% del total de las partículas inhaladas. Los estudios de retención en pulmones de mineros con silicosis han demostrado que se retiene de 2% a 5% del total de las partículas inhaladas durante todo el tiempo de exposición (23). Existen pruebas de que estos resultados se modifican de manera importante por los patrones respiratorios y por el tamaño de las partículas.

Como ya se mencionó, el sitio anatómico en donde ocurre el depósito de las partículas depende del tamaño de las mismas y de los cinco mecanismos de depósito señalados. Las partículas de la fracción respirable tienden a captarse preferentemente en los bronquiolos respiratorios, de acuerdo con los modelos matemáticos (23). Esta predicción parece confirmarse en los humanos, ya que las lesiones iniciales y el depósito de partículas en casos tempranos de asbestosis o enfermedad de los mineros del carbón, ocurren en este nivel (24, 25, 26). Estos hallazgos sugieren la posibilidad de que existan alteraciones obstructivas en la vía aérea menor en los estadios iniciales de la enfermedad pneumoconiótica, imputables a la pura inhalación de las partículas (27). Los estudios experimentales en ratas expuestas por vía nasal a diferentes partículas (asbesto, sílice, ceniza volcánica, etc.), demuestran que el depósito e inicio de las lesiones ocurren en el nivel de la primera bifurcación de las vías aéreas menores después del bronquiolo terminal, sugiriendo que la impactación de las partículas desempeña un papel importante como mecanismo de depósito (28, 29). En el caso de los roedores esta bifurcación corresponde al conducto alveolar por carecer de bronquiolos respiratorios. Cabe mencionar que esta situación se altera cuando el modelo experimental se basa en la instilación intratraqueal de las partículas (30, 31).

Otros factores importantes que se deben tomar en cuenta son la

composición y características físicas de las partículas. Existen algunas partículas que, a pesar de depositarse y retenerse en el pulmón, tienen efectos mínimos o nulos (p. ej.: hierro), en cambio, otras partículas presentan grados diversos de patogenicidad. Los estudios experimentales con sílice y asbesto han puesto la pauta para establecer la existencia de partículas inertes o patógenas y para establecer los mecanismos de daño celular en el caso de las patógenas (32).

Desde hace varios años se ha establecido una correlación importante entre la capacidad citotóxica de las partículas y su capacidad para inducir fibrosis pulmonar (33). De esta manera, las pruebas de hemólisis se han convertido en un instrumento primario para la evaluación de cualquier partícula que se sospeche como patógena.

Los estudios de cuarzo y asbesto han permitido proponer algunos mecanismos para explicar su citotoxicidad. En el caso del primero, originalmente se pensó que la disolución de las partículas en un medio acuoso liberaba ácido silícico, que era responsable de la ruptura celular (34). En la actualidad se acepta que el fenómeno de hemólisis depende de dos pasos: 1) adherencia de la partícula a la célula y 2) lisis o ruptura de membranas. La adherencia depende de grupos donadores de protones (silanol), que existen en la superficie de las partículas cuando se hidratan, y la lisis está mediada por las cargas negativas de la partículas impartidas por sus oxígenos (35). Estos mecanismos pueden ser bloqueados de manera independiente. La adherencia de las partículas a la superficie celular se bloquea con polímeros aceptores de protones como el óxido de polivinilpiridina y la acción lítica, con cationes como el aluminio (35). Existe prueba de que la ruptura de los glóbulos rojos expuestos a sílice resulta de la interacción de los radicales silanol ionizados (aniones) en la superficie de la partícula, con la proteína de la banda 3 de su membrana (32).

En el caso del asbesto su citotoxicidad parece estar mediada por las características iónicas de su superficie (la mayoría de las veces catiónica). En el caso de la variedad de asbesto crisotilo (silicato de magnesio), el mecanismo de citotoxicidad parece depender de la interacción del magnesio presente en su superficie con los residuos de ácido siálico de glucoproteínas o glucolípidos de la membrana (36, 37, 38). El empleo de agentes quelantes, como el EDTA, bloquea los efectos hemolíticos de las partículas (2).

El asbesto ofrece otras interrogantes en cuanto a su relación con el cáncer. Aquí los estudios experimentales en animales demostraron la importancia que tiene la dosis, composición y dimensiones de las fibras en el desarrollo de tumores. Wagner y col. (39) fueron los primeros en provocar mesoteliomas en ratas a las que se administró el asbesto intrapleuralmente. Años después, los trabajos de Stanton probaron que un factor determinante en la producción de los mesoteliomas por fibras de asbesto o de vidrio era el número de fibras dentro de un rango menor o igual a $1.5 \mu\text{m}$ de diámetro y mayores de $8 \mu\text{m}$ de largo, independientemente de su composición (Hipótesis de Stanton) (40, 41). Este último comentario resulta relevante, ya que los estudios epidemiológicos de mesotelioma y asbesto han señalado que las diferentes variedades de asbesto difieren en su potencial fibrogénico o cancerígeno (mesotelioma o broncogénico) (41). En el caso del mesotelioma, éste se observa con mayor frecuencia asociado de manera decreciente a exposiciones a crocidolita (asbesto azul), amosita (asbesto café), crisotilo (asbesto blanco) y antofilita (10). No obstante estas observaciones, los estudios experimentales no han corroborado estas diferencias. En cambio si se ha señalado que las dimensiones de las fibras desempeñan el papel más importante. Actualmente la hipótesis de Stanton no se considera exacta y hay pruebas de que la variable determinante para conservar su potencial

cancerígeno es una relación constante de 100:1 entre el largo y el diámetro de las fibras (32). En este caso, las características superficiales de las fibras también parecen desempeñar un papel importante, ya que cuando las fibras se tratan previamente con ácido pierden la capacidad de inducir neoplasias en animales de experimentación. Existen otros postulados que tratan de explicar el papel del asbesto en el desarrollo de tumores. Durante algún tiempo se pensó que las trazas de metales como Co, Ni o Fe, presentes en las fibras, pudieran estar determinando su capacidad cancerígena; sin embargo, años después se probó falso. También se ha postulado la posibilidad de que la adsorción de hidrocarburos policíclicos (bezopireno) en la superficie de las partículas sirviera como vehículo de este bien conocido factor iniciador de neoplasias y que el asbesto funcionara como un promotor (32). Estudios recientes *in vitro* han demostrado que el asbesto es capaz de producir transformaciones neoplásicas en cultivos celulares de fibroblastos o células mesoteliales de rata y humanas (6, 42), además de inducir rearrreglos cromosómicos (42). Estas pruebas sugieren que el asbesto tiene efecto cancerígeno *per se*, en el que las interacciones partícula-superficie celular desempeñan un papel importante.

En párrafos anteriores se señaló la correlación existente entre la capacidad citotóxica o membranolítica de las partículas y su capacidad fibrogénica sobre el pulmón. En años recientes se ha llamado la atención a los efectos que dichas partículas ejercen sobre las células sobrevivientes. Si bien es cierto que la destrucción celular resulta en la liberación de sustancias intracelulares con diversas funciones biológicas y que esta destrucción celular redundaría en disminución de la capacidad defensiva pulmonar, la acción sobre las células sobrevivientes podría generar la elaboración de múltiples sustancias moduladoras

de la respuesta inflamatoria y cicatrizal. Es más, la interacción de las partículas con sitios específicos de la membrana celular podría ser la manera de iniciación de algunos procesos intracelulares.

En la actualidad se acepta la participación central del macrófago alveolar en el proceso de eliminación e inicio de la respuesta pulmonar a partículas inhaladas (4, 7, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50). Como ya describimos anteriormente, el depósito de diversas partículas inhaladas ocurre en la primera bifurcación del conducto alveolar en la rata. Es en este sitio en donde también se inicia la respuesta pulmonar a estas partículas y se caracteriza por la migración y acúmulo de macrófagos alveolares en ese nivel. En el caso particular de la exposición a asbesto, la respuesta macrofágica parece estar mediada por la activación *in situ* del complemento (43), aunque existen pruebas de que otras partículas también son capaces de activar al complemento *in vitro* (51). La presencia de complemento en las secreciones pulmonares es bien conocida (52), y también que el asbesto es capaz de activarlo por la vía alterna (53, 54). Estudios *in vivo* en los que se expusieron ratas de complementada con veneno de cobra y ratas normales, mostraron ausencia casi total de respuesta macrofágica en las primeras a pesar de que en ellas hubo un depósito de fibras que fue similar al observado en las ratas control. El estudio de las secreciones pulmonares de estas ratas ha demostrado la presencia de un agente quimiotáctico con peso molecular de 10 - 15 kDa en las ratas control, que no apareció en las tratadas con veneno de cobra (43).

Estos y otros estudios han demostrado la participación central del macrófago en la progresión de las lesiones intersticiales pulmonares producidas por partículas inorgánicas.

Con esto se han abierto una serie de investigaciones tanto *in vivo* como

in vitro encaminadas a identificar los factores responsables de mantener la respuesta inflamatoria y de iniciar la respuesta fibrogénica. El mayor cúmulo de información se ha obtenido de estudios *in vitro* y queda por determinar su papel en el proceso *in vivo*.

Son muchos los factores macrofágicos producidos *in vitro* después de su estimulación con partículas como el cuarzo y el asbesto. Algunos de estos factores participan en el proceso inflamatorio, como son: metabolitos de ácido araquidónico (48), complemento (44), factores quimiotácticos para polimorfonucleares (45) y macrófagos (43, 46), interleucinas 1 (4) y 2 (47), PDGF (5), etc. Algunos otros factores se relacionarían con el proceso cicatrizal como: el factor de crecimiento fibroblástico producido por los macrófagos (56), además de la liberación de una buena cantidad de enzimas capaces de modular ambas respuestas (57).

Hasta ahora los datos permiten proponer una hipótesis en la que el proceso inicial que lleva a la fibrosis intersticial después de la inhalación de polvos inorgánicos sería la alveolitis. Esta se iniciaría con la participación del macrófago alveolar que sería activado por las mismas partículas, una vez que migró al sitio original de su depósito. Por lo menos en el caso del asbesto crisotilo, esta migración celular inicial depende de la activación del complemento, quedando por establecerse si *in vivo* opera un mecanismo similar para algunas otras partículas como el cuarzo. Una vez que se han puesto en contacto los polvos con los macrófagos, algunos serían destruidos por efecto directo, mientras que otros serían activados. Esta activación resultaría en la expresión de antígenos de superficie y la síntesis y liberación de otros factores quimiotácticos para macrófagos, polimorfonucleares, linfocitos, fibroblastos, etc. También se promovería la síntesis de factores de crecimiento para fibroblastos. La liberación

de estos mediadores dependería del tipo de agente inductor, sin que sepamos en la actualidad de los mecanismos involucrados en la síntesis o liberación de los mismos.

Las determinaciones de colágena en pulmones neumoconióticos de animales de experimentación indican que existe aumento en la síntesis de colágena con rearrreglos en la proporciones existentes de colágena I y III (58, 59). Esto se puede interpretar como manifestación de proliferación de fibroblastos por acción de factores de crecimiento y por aumento en la síntesis de colágena potencialmente estimulado por metabolitos del ácido araquidónico (prostaglandina E₂ o interleucina 1) (55). Actualmente sabemos de la existencia del factor "fibrogénico" producido por el macrófago alveolar, con peso molecular de 18 kDa, capaz de estimular aumento en la cantidad de RNA_m de colágena tipo I, quedando por determinarse la cantidad de esta fracción en relación a otro agente que tiene un potencial similar, que es la interleucina 1 (60). No se puede dejar de mencionar la posible participación del equilibrio entre síntesis y degradación de colágena, en la que estarían involucradas la colagenasa y la elastasa y algunos inhibidores como la α_1 antitripsina o la α_2 macroglobulina (61), en la génesis de la fase fibrosante de estas enfermedades.

Una última reflexión sobre la contaminación ambiental por partículas fuera del ambiente laboral nos obliga a mencionar la necesidad de mejorar nuestros métodos para identificar pacientes y agentes patógenos relacionados con ellas. Recientemente se ha mencionado en la literatura la existencia de enfermedades pulmonares en poblaciones abiertas expuestas a contaminantes naturales. Como ejemplo mencionaremos al asbesto en ciertas regiones de Turquía (41); la mica en el área de San Diego, California (62); alúmino silicatos en Mexicali, Baja California (63, 64); arena del desierto del Sahara (65) y la posibilidad de que

algunas cenizas volcánicas tengan un potencial patógeno importante (3, 11). También se debe mencionar la bien conocida asociación entre bronquitis crónica y contaminación mixta por gases y partículas en las grandes ciudades (66, 67).

Como se puede observar, aún existen una serie de interrogantes importantes en relación con la manera en que las partículas inorgánicas producen enfermedad y que van desde los mecanismos involucrados en el reclutamiento de células destinadas a la limitación del daño o a la progresión de la enfermedad hacia la fibrosis, hasta los procesos que median la interacción partícula célula y que determinarían el grado y tipo de respuesta celular para cada polvo. Al mismo tiempo habría que definir la combinación de eventos que hacen que un tipo de partículas actúe patógenicamente de modo distinto a otro, es decir, aquellas que son inertes de las altamente fibrogénicas o con diversos grados de fibrogenicidad. Este último punto adquiere relevancia cuando se trata de identificar a "nuevos" contaminantes como patógenos.

Esta tesis tiene como objetivo principal continuar una serie de experimentos encaminados a reconocer los eventos iniciales en la producción de enfermedad pulmonar por polvos inorgánicos. El trabajo se propone: 1) identificar la respuesta pulmonar temprana a la inhalación del polvo de Mexicali; 2) evaluar la capacidad del polvo de Mexicali para activar complemento en suero y en el lavado bronquioalveolar, como un factor inicial de quimiotaxis; 3) conocer la respuesta pulmonar a múltiples dosis inhaladas de un polvo inorgánico ampliamente estudiado, como es el asbesto crisotilo y 4) iniciar algunos estudios de los efectos del asbesto crisotilo sobre la función de la membrana del eritrocito,

después de haber producido hemólisis.

El primer y segundo objetivos continúan una serie de trabajos en los que hemos estudiado el potencial patógeno del polvo de Mexicali. Esto surgió después de haber identificado un paciente con enfermedad intersticial pulmonar que contenía gran cantidad de partículas inorgánicas idénticas a las recolectadas en su ambiente doméstico (64). Nuestros estudios previos demostraron la capacidad hemolítica del polvo (63) y su capacidad para producir una lesión intersticial multifocal en los pulmones de ratas instiladas con 50 mg (68). Estos resultados indicaron la capacidad patogénica de este aluminosilicato, por lo que decidimos continuar su estudio con la hipótesis de que la respuesta pulmonar temprana a la inhalación del polvo resultaría en una migración celular hacia las partículas depositadas en las bifurcaciones de los conductos alveolares, tal y como ocurre con otros polvos (29). Al mismo tiempo consideramos que el potencial para iniciar la respuesta quimiotáctica estaría mediado por la capacidad del polvo para activar al sistema del complemento, tanto en el suero como en las secreciones pulmonares.

Aunque existen datos previos en la literatura de algunos alúmino silicatos que son capaces de producir fibrosis pulmonar (62), poco se sabe de su patogenia, con excepción de la ceniza del Monte Santa Elena, que siendo un alúmino silicato, probó ser ligeramente fibrogénico (11), incapaz de activar al complemento sérico (69) y capaz de inducir una pequeña migración de macrófagos al sitio donde se depósito la ceniza después de su inhalación en ratas (29, 51).

Nuestro tercer objetivo se centró en un modelo de inhalación de asbesto

crisotilo, con la idea de conocer el patrón de depósito y de respuesta celular a tres dosis subsecuentes de asbesto. La finalidad de trabajar con asbesto se deriva de lo bien caracterizado que está el modelo para una dosis (22, 29, 46, 70) y la consecuente facilidad para hacer comparaciones. La hipótesis de trabajo es que a una mayor exposición, la distribución de las fibras sería mayor y más "profunda", al igual que la respuesta celular. Adicionalmente nos propusimos estudiar la adhesividad de las células al epitelio, después de su migración hacia el sitio de depósito del asbesto. Para esto se "lavarón" los pulmones después de la exposición y se contaron las células recuperadas y las que permanecieron adheridas en las bifurcaciones bronquiolares en los pulmones, comparando los animales expuestos a una dosis con los expuestos a tres. Esta idea se originó del hecho de que a pesar de que la respuesta a una dosis de asbesto resulta en la movilización de macrófagos, el número de células recuperadas en el lavado no es significativamente diferente de las recuperadas de animales control (71). Por lo tanto, si la exposición múltiple a asbesto resulta en mayor acúmulo de células, el lavado bronquial debería de contener mayor número de macrófagos, si estos no se adhieren al epitelio alveolar.

Por último, nuestro cuarto objetivo se relaciona con el efecto directo de las partículas sobre las células blanco. Una vez más se escogió al asbesto crisotilo por existir un gran número de observaciones previas en relación con su efecto sobre el eritrocito (2, 36, 37). Este representa un modelo simple de toxicidad que se manifiesta por ruptura celular y que correlaciona con el potencial fibrogénico del asbesto (2). Existen varias propuestas para explicar el mecanismo de la hemólisis inducida por el asbesto (2, 36, 37, 72). Sin embargo, la mayoría acepta que la adhesión de la partícula a la membrana es fundamental y esta mediada por la carga positiva del asbesto crisotilo y su interacción con cargas

Introducción

negativas en su superficie dadas por las glucoproteínas (36) o por los lípidos (38). Aunque la lisis parece ser el resultado de reacomodos en la membrana (72), poco se han explorado los trastornos funcionales de algunos de sus componentes. Aquí exploramos la función de las ATPasas de $[Na^+, K^+]$ y de $[Ca^{++}, Mg^{++}]$, con la idea de que si el asbesto se une a las glucoproteínas, la actividad de la ATPasa $[Na^+, K^+]$ se vería alterada y no la de la ATPasa $[Ca^{++}, Mg^{++}]$, lo que posiblemente podría desempeñar algún papel en el desarrollo de la lisis celular.

MATERIAL Y METODOS

Exposición de Ratas a Polvo de Mexicali

Polvo de Mexicali: El polvo de Mexicali (PM) se obtuvo en forma "cruda" de la ciudad de Mexicali, B.C. y se separó por tamaños tamizando repetidamente la muestra (63). Como resultado de esta separación se obtuvo una muestra que atravesó el tamiz de malla 200 y cuyo diámetro promedio fue de 10 μm . La composición de la muestra correspondió en su mayoría a un alúmino silicato de potasio y en menor grado de otros cationes (64, 68) (Fig. 1).

Exposición: Las exposiciones se llevaron a cabo en el National Institute of Environmental Health Sciences, Inhalation Toxicology Research Program, Northrop Services, Inc. en Research Triangle Park, North Carolina, U.S.A. (73). Se emplearon 35 ratas macho CD-1 (Charles River) de ocho semanas de edad que fueron expuestas por vía nasal durante 3 horas a un aerosol de PM o a aire ambiente filtrado. Las exposiciones se hicieron colocando los animales en jaulas que contenían cajas de plexiglas dentro de unas cámaras donde se generó un aerosol de PM de 48 mg/m^3 de aire. Las cámaras de exposición (74) se ventilaron con aire filtrado alrededor de 20°C a 200 l/min, manteniendo una presión de -7.5 cmH_2O . Los animales control se expusieron a aire filtrado en cámaras similares. El aerosol de PM fue generado con un generador de polvo 2 Mark 2 Timbrell

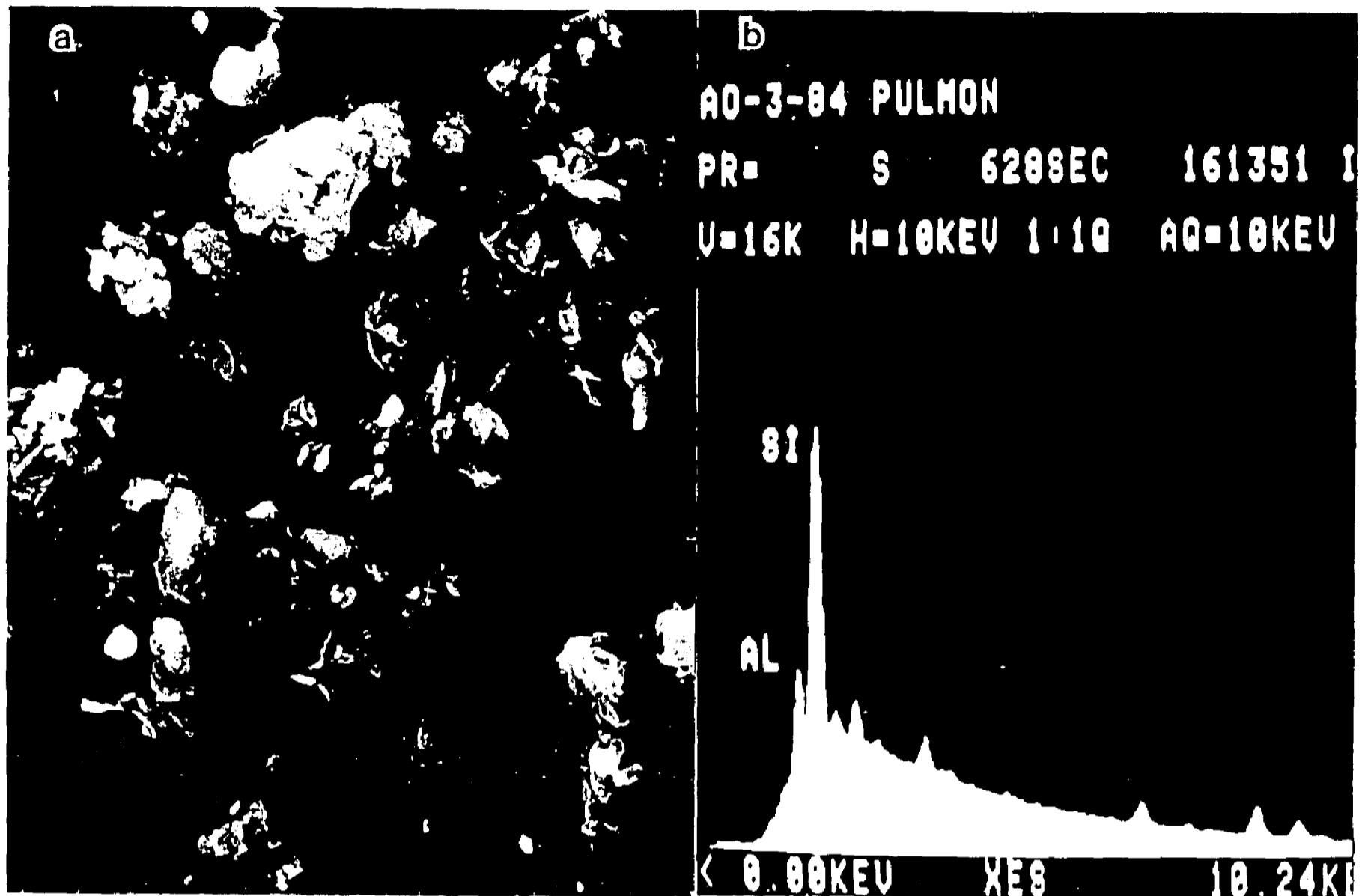


Figura 1. Aspecto al microscopio electrónico de barrido del polvo de Mexicali (a) (2 530x) y cuyas partículas contienen principalmente aluminio y silicio y otros cationes como potasio, de acuerdo al microanálisis de rayos-x (b).

(Rank Brothers) y la concentración de polvo se cuantificó con un aparato de impactación por inercia (Batelle DC2-6) (75).

Obtención, Manejo y Observación de los Tejidos en el Microscopio Electrónico de Barrido (MEB): Después de la exposición de tres horas, siete animales se sacrificaron con una sobredosis de Nembutal (63 mg) (Grupo 3/0 = 3 hrs. de exposición / 0 hrs de recuperación). El resto de los animales se

sacrificaron: seis después de 24 horas (**Grupo 3/24** = 3 hrs. de exposición / 24 hrs. de recuperación), seis después de ocho días (**Grupo 3/8** = 3 hrs. de exposición / 8 días de recuperación) y seis después de un mes (**Grupo 3/1** = 3 hrs. de exposición / 1 mes de recuperación). Dos de los animales control (**Grupo C**) se sacrificaron al término de la exposición, dos después de 24 horas, dos después de ocho días y dos después de un mes. Antes de la muerte de los animales se disecó la tráquea y se ligó con sutura de algodón o se le conectó una cánula del número 16. En tres de los animales del grupo 3/0 se ocluyó la tráquea y se abrió el tórax y el abdomen para fijar por vía vascular a los pulmones (**3/0v**). Se introdujo una aguja del número 19 en la arteria pulmonar a través del ventrículo derecho, se cortó la aorta abdominal y simultáneamente se inyectó solución salina 0.9% a la vasculatura pulmonar a 20 cmH₂O.

La sangre del pulmón se lavó en aproximadamente 30 segundos y se inició la perfusión con fijador de Karnovsky (76). En los otros cuatro animales de grupo 3/0 (**3/0a**) y en el resto de las ratas, la fijación se hizo por vía traqueal, instilando el mismo fijador a 15 cmH₂O de presión.

Después de 15 min se extrajo el bloque cardiopulmonar y se introdujo en un frasco con el mismo fijador durante 18-24 horas a 22°C. Al término de la fijación se hicieron cortes parasagitales de ambos pulmones y se procesaron para microscopía de luz (ML) y MEB. Los tejidos para ML fueron incluidos en parafina, cortados a 5 µm y teñidos con hematoxilina y eosina (**H y E**). Los tejidos para MEB se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (del 60% a absoluto) y se secaron al punto crítico con CO₂ líquido (Samdri 780A, Tousimis). Los cortes secos se pegaron en discos de carbón con grafito coloidal (Ladd Research Industries) para diseccionar los bronquiolos terminales (**BT**) y conductos alveolares (**CA**) bajo un microscopio estereoscópico (Zeiss) a 4x. Después de la

disección se cubrieron los bloques con una capa de oro de aproximadamente 30 nm (Ion Sputter JFC 1100, JEOL). Los tejidos se mantuvieron en un desecador hasta ser observados a 20 kV en un MEB (JSM 35C, JEOL), equipado con un detector anular para electrones retrodispersos (MER) y un equipo para microanálisis de rayos-x por energía dispersiva (MRx) (Kevex 7000). Esto se hizo con objeto de estudiar la distribución del polvo inhalado y la respuesta celular al mismo. La identificación de las partículas de polvo siempre se hizo por MER y se comprobó por MRx. Se estudió un bloque de tejido por cada pulmón y un promedio de 8 unidades anatómicas (Fig. 2) (bronquiolo terminal y las dos primeras generaciones de conductos alveolares) por cada rata. Los resultados se expresaron como número y porcentaje de unidades anatómicas con partículas y/o células.

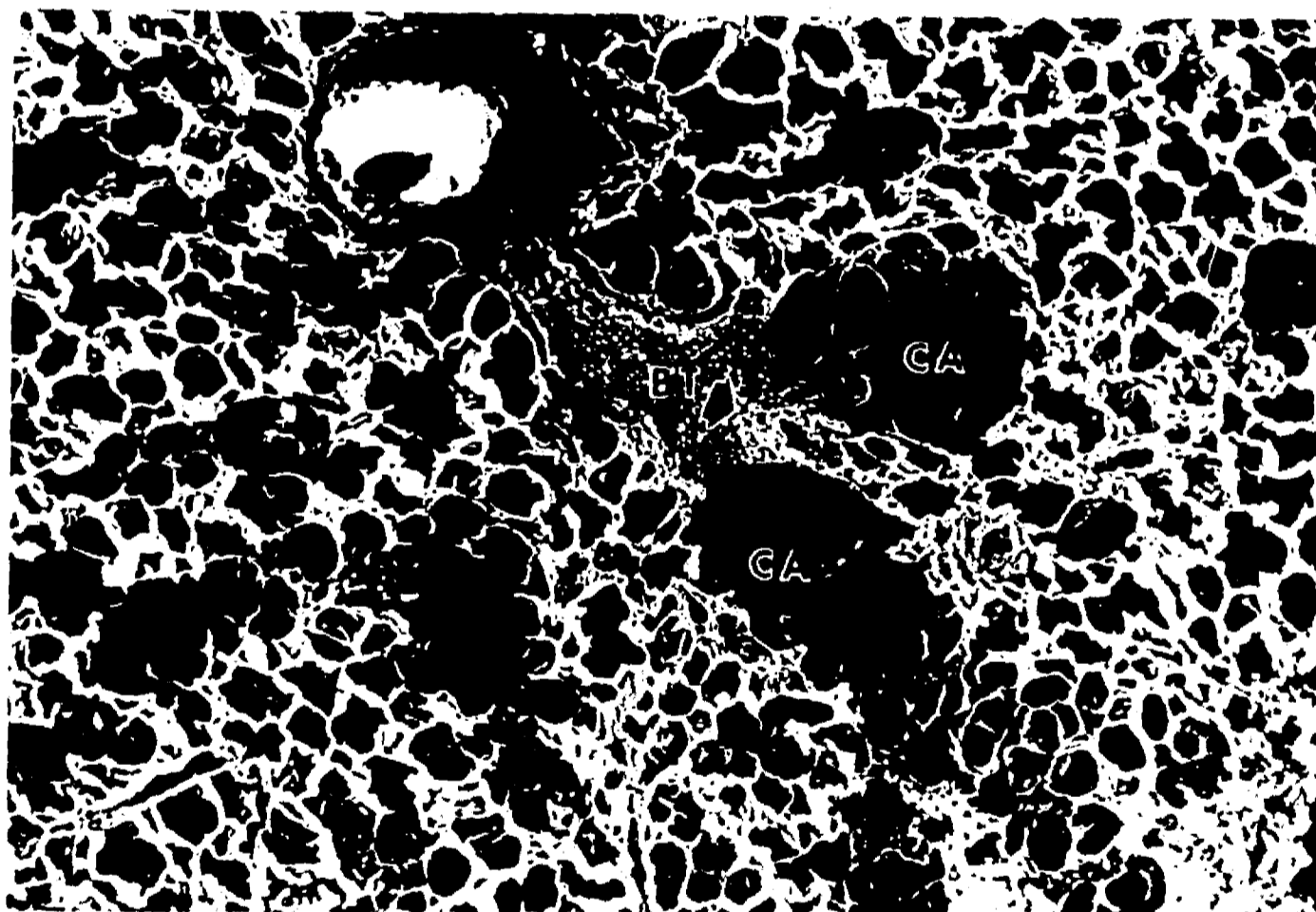


Figura 2. La disección de los pulmones permite descubrir el trayecto de los bronquiolos terminales (BT) hasta los conductos alveolares (CA) y sus puntos de bifurcación (flecha). Esto es indispensable para el estudio del depósito y distribución de las partículas inhaladas (MEB, 138x).

Actividad Quimiotáctica para Macrófagos Alveolares (MA) por Suero Activado por PM

Activación del Suero: Se obtuvo suero de ratas (S) macho Wistar (300 gr) por punción cardíaca. El suero fresco se incubó a 37°C por 45 min con zimosán (Z) (Sigma) (10 mg/ml), PM (diámetro promedio de 3.5 µm) (25 mg/ml), asbesto crisotilo (A) (Johns-Manville, Co., dimensiones promedio de 10 µm x 0.3 µm) (25 mg/ml), α cuarzo (αC) (Min-U-Sil, PA Sand Glass, Co., diámetro promedio de 3 µm) (25 mg/ml) y hierro carbonilo (Fe) (General Aniline, diámetro promedio de 1.6 µm) (25 mg/ml). Al término de la incubación se inactivó el suero por calentamiento a 56°C/45 min. Las muestras se centrifugaron a 34 249 x g/20 min (Centrifuga IEC B-20A) para eliminar las partículas del suero. En otro grupo de experimentos las partículas fueron incubadas en muestras de suero previamente calentadas a 56°C/45 min.

Todos los experimentos de activación por polvos inorgánicos (desde la obtención de los MA) se realizaron con material desechable sin endotoxina (Falcon o Corning) o con material horneado a 180°C/4 horas (inclusive los polvos inorgánicos) (77). El agua empleada no contiene endotoxina detectable por E-Toxate (Sigma) (78).

Quimiotaxis: Los experimentos se hicieron con MA obtenidos por lavado bronquioalveolar (LBA) de ratas macho Wistar (300gr). Los lavados se realizaron canulando la tráquea de ratas anestesiadas con Nembutal (25 mg/kg) y llenando los pulmones con solución salina amortiguada con fosfatos pH 7.4 (PBS) a 15 cmH₂O. Los pulmones se vaciaron por gravedad (LBA s/masaje) y la operación se repitió unas seis veces hasta completar 50 ml. Las células se separaron por

centrifugación a 475 x g/10 min a 4°C (Centrifuga IEC Centra 8R), obteniéndose un promedio de 2×10^6 MA viables (viabilidad del 95 - 98%, azul Tripán - Matheson, Co.- al 0.5% en PBS) por rata. Los macrófagos alveolares se lavaron dos veces en la misma solución para finalmente resuspenderlos a una concentración de 1.5×10^6 MA/ml en RPMI 1640 (Gibco) con HEPES (Sigma) 10mM y albúmina sérica bovina fracción V (Sigma) al 2% (**medio de quimiotaxis**). La quimiotaxis se hizo en cámaras de Boyden modificadas (79), en cuyo compartimento inferior se colocaron 105 μ l de la sustancia quimiotáctica y en el superior, 200 μ l de la suspensión de macrófagos. Ambos compartimentos se separaron con filtros de Nucleopore con poros de diámetro promedio de 5 μ m. La concentración óptima de los sueros activados se hizo diluyendo las muestras al 1%, 5% y 10% con medio de quimiotaxis. La migración de los macrófagos se evaluó después de tres horas de incubación a 37°C en un incubador con atmósfera de CO₂ al 5% (Forma Scientific 3158). Al término de la incubación se contaron las células que migraron a la superficie inferior del filtro, después de haber eliminado las células que quedaron sobre la cara superior del filtro. Las células se fijaron con metanol y se tiñeron con Leuko Stat (Fisher Diagnostic). La cuantificación celular se hizo en 20 campos preseleccionados a 100x y se expresaron como número total de células en los 20 campos. Los resultados se expresaron como porcentaje de macrófagos alveolares en 20 campos (**%MA/20C**), tomando como 100% a los macrófagos que migraron hacia el suero activado con zimosán y después de haber restado las células que migraron hacia el medio de quimiotaxis. Paralelamente se corrieron experimentos de quimiocinesis invirtiendo e igualando los gradientes. También se corrieron controles contra suero normal inactivado y medio de quimiotaxis. Cada experimento incluyó tres filtros de cada suero activado por los diferentes polvos.

Determinación del Complemento en el Suero Activado con Partículas Inorgánicas

Esto se realizó por el método de Mayer (80) y se trabajó con sueros control y activados no de complementados y diluidos 1:75, en amortiguador de veronal gelatina. Se escogió esta dilución por que los tres volúmenes de suero (0.8, 1.0 y 1.2 ml) empleados en la prueba dieron niveles de hemólisis entre el 20% y el 80%. La prueba se hizo con eritrocitos de carnero sensibilizados con anticuerpos antieritrocito preparados en conejo (Depto. Inmunología, I.N.C.I.Ch.), a 37°C durante 60 min. Al término de la incubación las muestras se centrifugaron a 475 x g/10 min y el sobrenadante se leyó en un espectrofotómetro (Beckman 25) a 540 nm, para cuantificar la hemoglobina liberada. Cada experimento se corrió con un blanco de eritrocitos sensibilizados más amortiguador y un control del 100% de hemólisis, producido al incubar con agua destilada a los eritrocitos sensibilizados. Los resultados se expresaron en unidades de complemento hemolítico al 50% de lisis (**UCH₅₀**; normal 20-50).

Determinación de Complemento y Actividad Quimiotáctica para MA en LBA Activado por Partículas Inorgánicas

LBA: Las proteínas se obtuvieron de ratas macho Wistar (300 gr) , en las que después de canulación traqueal se extrajeron los pulmones para llenarse directamente con PBS. Este se recuperó después de dar masaje directo y suave a los pulmones (**LBA c/masaje**). La operación se repitió seis veces hasta

completar un volumen de 50 ml. Las células se separaron por centrifugación a $475 \times g/10$ min y se obtuvo un promedio de 10×10^6 MA/rata. Posteriormente, el sobrenadante se centrifugó a $178\ 000 \times g/60$ min para separar *detritus* y surfactante particulado. Tanto el LBA c/masaje como el s/masaje, permiten obtener en el sobrenadante de 1-2 mg de proteína/rata. El sobrenadante se dializó contra agua durante 18 horas y se concentró 5x a 4°C con Aquacide (Calbiochem) en bolsas de diálisis con exclusión nominal de 10 kDa. La concentración de proteína se ajustó a 1.2 mg /ml, se liofilizó y se guardó a -4°C hasta su uso (78).

Doble Inmunodifusión: Se produjo un anticuerpo contra C_{3b} de rata en conejos Nueva Zelanda (4kg). El antígeno se obtuvo después de incubar a $37^{\circ}\text{C}/45$ min suero de rata con zimosán (10 mg/ml) previamente hervido (30 min) y lavado seis veces en solución salina. Al término de la incubación se separó el botón, centrifugando a $1\ 900 \times g/10$ min a 4°C y se lavó otras seis veces en la misma solución. Los conejos se inmunizaron con 150 mg del complejo C_{3b} -zimosán (botón) en 6 ml y recibieron dos refuerzos con siete días de diferencia. El suero se obtuvo por punción cardíaca a la cuarta semana y se congeló a -70°C en alícuotas de 500 μl hasta su uso. La titulación del antisuero se hizo por doble inmunodifusión en agarosa II (Sigma) al 1% en amortiguador de barbital pH 8.0 (Sigma de México), contra suero de rata y contra el complejo inyectado. El antisuero se probó contra distintas diluciones de LBA concentrado (68 mg/ml) y contra albúmina de rata obtenida en nuestro laboratorio (81). Las lecturas se hicieron a las 24 horas, mateniendo los geles a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

Activación del LBA: La activación se hizo de la misma manera descrita

para el suero. En este caso se emplearon 5 mg/ml de A, PM y α C y 1 mg/ml de Z. El LBA fue resuspendido en el medio de quimiotaxis a una concentración de 1.2 mg/ml.

También se hicieron incubaciones del LBA con los diferentes polvos en presencia de EGTA (Sigma) o EDTA (Laitz) 10 mM, como inhibidores de la activación del complemento por la vía clásica (dependiente de Ca^{++}) o de ambas (dependientes de Ca^{++} y Mg^{++}), respectivamente (49, 82). El medio de quimiotaxis contiene Ca^{++} a una concentración de 400 μM y Mg^{++} a 200 μM (Gibco). La inactivación postincubación del LBA y la eliminación de las partículas se hizo como ya se mencionó previamente.

Metodo de Mayer: También se determinó la presencia y activación del complemento en el LBA activado con las partículas inorgánicas, siguiendo el método de Mayer (80). Para esto se empleó LBA no inactivado a una concentración de 1.2 mg/ml en medio de quimiotaxis.

Quimiotaxis: Se realizó bajo las mismas condiciones ya descritas para el suero, empleando lavado activado a una dilución del 50% en medio de quimiotaxis. También se corrieron experimentos con el lavado activado en presencia de EGTA y EDTA.

Exposición Múltiple a Asbesto

Exposición: Se expusieron 54 ratas CD-1 de ocho semanas de edad

(Charles-River) a un aerosol de asbesto crisotilo de 14 mg/m^3 de aire. Otros 54 animales sirvieron como controles y fueron expuestos a aire filtrado. Las exposiciones se hicieron bajo las condiciones ya descritas. Veintisiete ratas recibieron una dosis única de tres horas (**Grupo U** = exposición única) y se sacrificaron de la siguiente manera: 11 inmediatamente después de terminada la exposición (**Grupo U/0** = exposición única / 0 hrs. de recuperación), 8 a las 24 horas (**Grupo U/24** = exposición única / 24 hrs. de recuperación) y 8 a los 8 días (**Grupo U/8** = exposición única / 8 días de recuperación). Las otras 27 ratas, se expusieron a tres dosis diarias de tres horas cada una (**Grupo T** = exposición triple) y se sacrificó el mismo número de animales a los mismos intervalos que las de dosis única: T/0 (11 ratas), T/24 (8 ratas) y T/8 (8 ratas). Los animales control se sacrificaron en grupos de ocho para cada grupo experimental.

Manejo de los Animales: De los ocho animales de cada grupo, cinco se usaron para colectar LBA c/masaje y en tres se fijaron los pulmones para ML y MEB. En el caso de los 11 animales de los grupos U/0 y T/0, tres se fijaron por vía vascular y tres por vía aérea. Los detalles de la fijación, proceso y observación de los tejidos ya fueron expuestos.

LBA: Se procedió a separar las células del LBA en los animales de tiempo 0 y de 24 horas. El sobrenadante se dividió en dos alícuotas, una de las cuales se calentó a $56^{\circ}\text{C}/45 \text{ min}$ y la otra se congeló inmediatamente a -70°C . Ambos grupos de muestras se mantuvieron a esta temperatura hasta proceder a concentrarlas 5x contra Aquacide; después de separar una vez más a cada alícuota en dos. Una se concentró empleando una membrana de diálisis (Spectra Por 6) cuyo corte nominal es a 10 kDa y otra a 25 kDa. Las muestras se dializaron contra agua durante 18 horas y se liofilizaron. Con estas muestras se hicieron

experimentos de quimiotaxis (ya descritos) al resuspenderlas en medio de quimiotaxis a 260 µg/ml. Las células obtenidas del LBA (10×10^6 /rata) se lavaron con PBS dos veces y se resuspendieron en Medio Mínimo Esencial de Dulbecco (Gibco) a una concentración de 2×10^6 MA/ml. El medio contenía fungizona 1 µg/ml, penicilina 3 µg/ml y estreptomina 50 µg/ml. Las células se sembraron bajo condiciones de esterilidad en placas de cultivo con 20 pozos y en cuyos fondos se colocaron cubreobjetos redondos (Thermanox) (2.5×10^5 MA/pozo). Después de 45 min de incubación a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%, se lavaron los pozos con medio de cultivo y se fijaron los macrófagos adheridos para ser observados al MEB. Esto permitió conocer el porcentaje de macrófagos alveolares que fagocitaron asbesto después de la exposición y para lo cual se analizaron 200 células con el rastreador puntiforme del MRx. La existencia de asbesto intracelular se determinó al generar un espectro con magnesio y silicio.

Exposición de Eritrocitos Humanos a Asbesto Crisotilo

Eritrocitos: Los eritrocitos se obtuvieron de unidades de sangre del Banco de Sangre del I.N.C.I.Ch., que habían vencido uno o dos días antes del experimento. Las células se separaron por centrifugación a $475 \times g/10$ min a 4°C y se lavaron tres veces en cuatro volúmenes de una solución isotónica (277 mOsm/Kg) (Osmette A, Precision Instruments) de KCl (Merck) 130mM, Tris (Merck) 20 mM, pH 7.4. Las células se mantuvieron a 4°C en forma de paquete hasta su uso.

Asbesto Crisotilo: El asbesto crisotilo empleado correspondió a una

fracción en donde el 95% de las fibras tenían menos de 6 μm de longitud y menos de 0.2 μm de diámetro (Fig. 3). Esto se logró sonicando (LR Ultrasonic T7) por una hora suspensiones de 1 gr/l de asbesto en una solución de KCl 130 mM, Tris 20 mM, pH 7.4 (37). Posteriormente se separaron las fibras grandes por centrifugación a 200 x g/10 min a 4°C, para ser desechadas. Las fibras del sobrenadante fueron concentradas por centrifugación a 2 500 x g/10 min a 4°C y resuspendidas en una solución de Tris 10 mM, pH 7.4. Se lavaron cuatro veces más en la misma solución, centrifugando a 34 249 x g/10 min a 4°C. Preparamos cantidad suficiente de fibras de asbesto para todos los experimentos subsecuentes y se guardaron a -20°C hasta su uso.

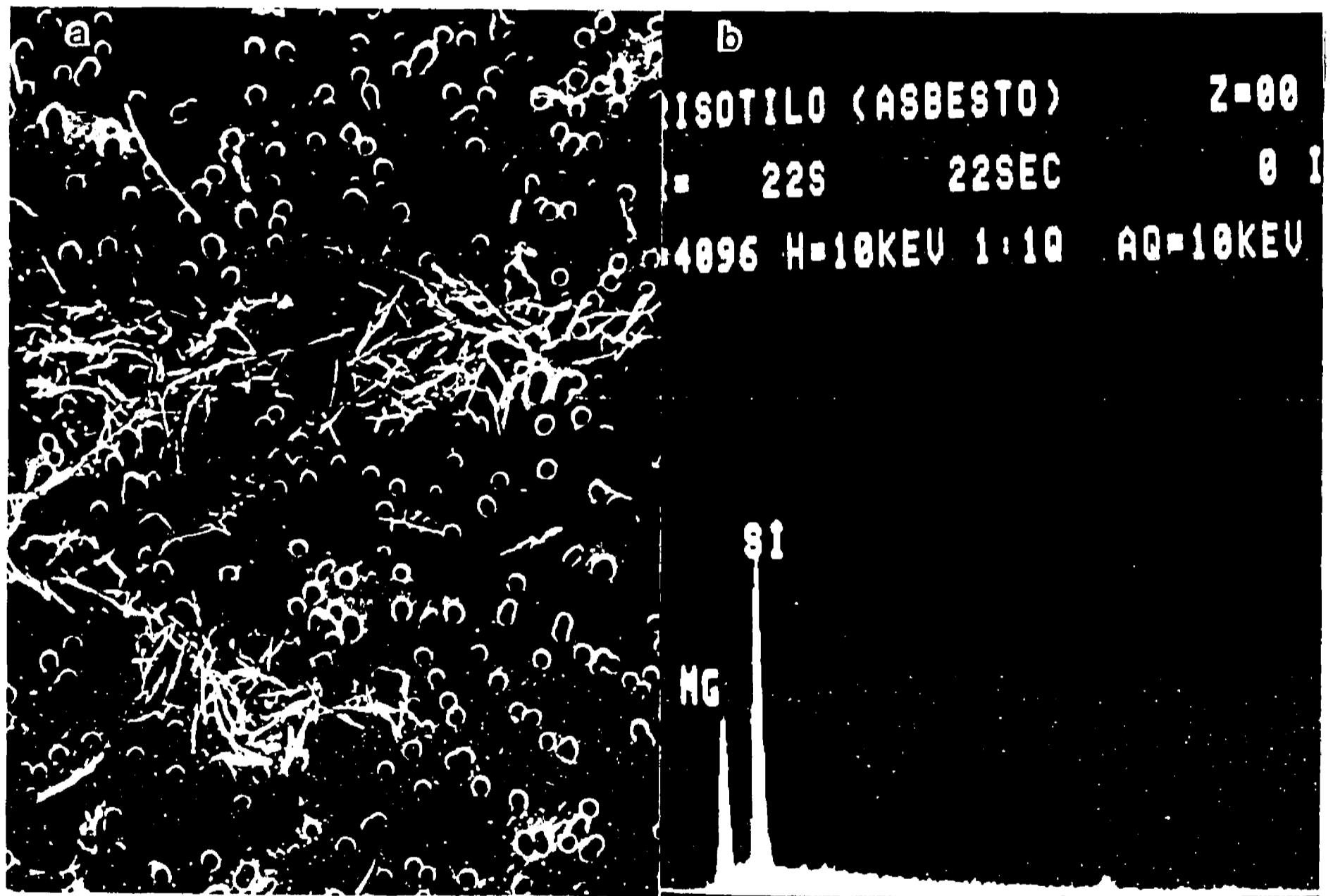


Figura 3. Muestra del asbesto empleado después de haberse sometido a ultrasonido. El tamaño de las partículas es homogéneo (a) (MEB, $\times 320$). El microanálisis de rayos-x demuestra los elementos que componen al asbesto crisotilo (b).

El análisis gravimétrico de alícuotas secas de estas fracciones demostró una concentración final de 19.25 mg/ml de asbesto. El tamaño de las fibras se estableció por MEB en muestras de asbesto que se dejaron secar sobre discos de carbón y se observaron al MEB a 20 kV.

Exposición: Se prepararon suspensiones de eritrocitos en KCl 130 mM, Tris 20 mM, pH 7.4 (100×10^6 /ml), a las que se agregaron las siguientes dosis de asbesto: 2.69, 5.39, 10.78, 21.56 y 43.12 μ g/ml. Las suspensiones fueron incubadas durante 30 min a 37°C con agitación moderada. Se corrieron en paralelo controles sin asbesto. Las interacciones partícula célula se evaluaron por el grado de hemólisis desarrollada y por la observación directa al MEB.

El grado de hemólisis se determinó en los sobrenadantes de las suspensiones de eritrocitos al término de la incubación. Para tal efecto se centrifugaron 3 ml de la suspensión a 475 x g/10 min a 4°C y el sobrenadante se leyó a 540 nm en un espectrofotómetro. Los resultados se expresaron como porcentaje de hemólisis en base a la hemólisis producida al incubar una suspensión con el mismo número de células en agua destilada (100% de hemólisis).

Al término de las incubaciones se tomaron 500 μ l de cada suspensión para fijarlos a 4°C durante una hora en 3 ml de fijador de Karnovsky. Después de fijadas las células se filtraron en membranas de Nucleopore con un diámetro promedio de poro de 0.8 μ m. Se lavaron en el mismo amortiguador de cacodilato de sodio (SPI Supplies) 0.1M pH 7.4, se deshidrataron y se secaron al punto crítico. Los filtros se montaron en discos de carbón y se cubrieron con oro para observarlos y fotografiarlos al MEB.

Obtención de Fantasma: Al término de las exposiciones las suspensiones se centrifugaron a 2 500 x g /10 min a 4°C y se procedió a completar la lisis celular con choques osmóticos (83). Para esto se agregó una solución fría de Tris 5 mM, EDTA 1 mM , pH 7.4 y se centrifugaron las muestras a 26 664 x g/10 min a 4°C. Los lavados se repitieron seis veces hasta obtener un botón blanco y un sobrenadante libre de hemoglobina. El botón se lavó tres veces más con Tris 10 mM, pH 7.4 y se compactó centrifugando a 34 249 x g/10 min a 4°C. Los fantasmas se homogenizaron con 15 pases de pistilo, se tomaron alícuotas para determinación de proteína y se congelaron a -70°C hasta su uso. Todos estos experimentos se repitieron seis veces a partir de sangres diferentes. Los ensayos siempre se hicieron con membranas congeladas y descongeladas una sola vez. La determinación de proteína se hizo por el método de Bradford (84), empleando como estandar una solución de albúmina sérica bovina de 1 mg/ml.

Los fantasmas se observaron con tinción negativa en el microscopio electrónico de transmisión (MET). Las muestras se diluyeron con amortiguador (1:9) y se colocaron sobre rejillas de cobre cubiertas con formvar (Ladd). Se tiñeron con ácido fosfotúngstico (Merck) al 2% en Tris 10 mM, pH 7.4 y se observaron en un microscopio Zeiss EM-9 a 60 kV.

Actividad de las ATPasas de [Na⁺, K⁺] y de [Ca⁺⁺, Mg⁺⁺] en Fantasma de Eritrocitos Expuestos a Asbesto

Incubación con Tritón X-100: Se probaron las actividades de ambas ATPasas en ausencia y en presencia de Tritón X-100 (BioRad) (85) al: 0.003125%, 0.00625%, 0.0125%, 0.025% y 0.05%, tanto en fantasmas control

como con asbesto.

Mezclas de Reacción: En estos experimentos se emplearon fantasmas control y los expuestos a las tres últimas dosis de asbesto. Se incubaron alícuotas de 30 μg de proteína a 37°C/15 min con las siguientes mezclas de reacción. Para la ATPasa de $[\text{Na}^+, \text{K}^+]$ se empleó una mezcla de reacción con las siguientes concentraciones finales de: Tris-HCl, pH 7.4 50 mM; MgCl_2 4 mM; NaCl 100 mM; KCl 20 mM; EGTA 500 μM y ATP 3 mM (86). Siempre se corrió en paralelo un experimento en presencia de ouabaína 50 μM y en donde se sustituyó el KCl por cloruro de colina (Sigma) 20 mM. Para la ATPasa de $[\text{Ca}^{++}, \text{Mg}^{++}]$ se empleó: Tris-HCl, pH 7.4 50mM; MgCl_2 4 mM; CaCl_2 50 μM ; KCl 120 mM y ATP 3 mM (87). Igualmente se corrieron en paralelo experimentos sin CaCl_2 y en presencia de EGTA 500 μM . Las reacciones se iniciaron agregando la mezcla de reacción fría (4°C) a la que se le agregó el ATP inmediatamente antes de iniciar la reacción. La actividad de las enzimas estudiadas se expresó como el resultado de restar a la actividad total, la actividad persistente en presencia de ouabaína y en ausencia de Ca^{++} , respectivamente. Las actividades enzimáticas siempre se estudiaron en fantasmas preincubados a 37°C/10 min con Tritón X-100 al 0.0125%, en base a los resultados obtenidos de la sección anterior.

Determinación de P_i por el Método de Lanzetta (88): La actividad de las ATPasas se determinó midiendo el P_i liberado. Al término de la incubación se agregó a cada tubo 1 600 μl de reactivo de Lanzetta (verde de malaquita -Laitz- 0.03375%, molibdato de amonio -Baker- en HCl -Merck- 1N al 1.05% y Tritón X-100 al 0.08%) y un minuto después, se agregaron 200 μl de citrato de sodio (Merck) al 34%. Después de 30 min se leyeron los tubos a 660 nm. La

Material y Métodos

cuantificación de P_i se hizo contra una curva de concentración hecha a partir de una solución de KH_2PO_4 (Merck) 1 mM. Antes de preparar la solución, la sal fue horneada a $60^{\circ}C/18$ horas. La determinación de P_i también se hizo con concentraciones conocidas de P_i , en presencia y ausencia de asbesto sin proteína a las concentraciones empleadas con los fantasmas. Los resultados se expresaron como nanomoles de P_i por mg de proteína por minuto.

También se estudió la actividad de las ATPasas en fantasmas control a los que se agregaron las mismas concentraciones de asbesto empleadas con los eritrocitos. En estos casos las membranas se preincubaron a $37^{\circ}C/30$ min con agitación moderada, en presencia de las 3/4 partes de la mezcla sin ATP. De igual manera, la reacción se inició con el resto de la mezcla de reacción más el ATP recientemente mezclado. Se realizaron tres experimentos en los que se agregó asbesto sin proteína (10.78, 21.56 y 43.12 $\mu g/ml$) a unas mezclas de reacción que contenían $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ (7 000 cpm). La radiactividad se determinó en un contador de centelleo (Beckman LS 7800), tanto en la mezcla total como en el sobrenadante después de centrifugar a $2\ 500 \times g/10$ min a $4^{\circ}C$.

Liberación de Acido Siálico (AS) por Acción de la Neuraminidasa en Fantasmas de Eritrocitos Expuestos a Asbesto

Se determinó la liberación de AS de las membranas con y sin asbesto (100 μg de proteína) en presencia de Tritón X-100 al 0.1%, usando 40 $\mu g/ml$ de Neuraminidasa V de *Clostridium perfringens* (Sigma). La incubación se hizo a $22^{\circ}C/30$ min en amortiguador de acetatos (Baker) 0.1 M, pH 5.0. La neuraminidasa se suspendió y almacenó a $4^{\circ}C$ en una solución de albúmina sérica bovina 0.3 mg/ml (89). También se hicieron experimentos en los que se

emplearon fantasmas control y a los que se agregaron concentraciones conocidas de asbesto.

Determinación de AS: Esto se hizo de acuerdo al método del ácido tiobarbitúrico (90). Las determinaciones se hicieron tanto en el sobrenadante como en el botón de una suspensión de fantasmas previamente tratados con la neuraminidasa y centrifugados a 2 500 x g/10 min a 4°C. A cada fracción (200 µl) se le agregaron 100 µl de periodato de sodio (Laitz) 0.2 M en ácido fosfórico (Merck) 9 N y se incubó por 20 min a 22°C. Posteriormente se agregó 1 ml de arsenito de sodio (Baker) al 10% en sulfato de sodio (Merck) 0.5 M, ácido sulfúrico (Merck) 0.1 N y se agitaron hasta que desapareció el color formado (café). Se agregaron 3 ml de ácido tiobarbitúrico (Sigma) 0.6% en sulfato de sodio 0.5 M. Se pusieron las muestras en agua hirviendo durante 15 min para desarrollar color (rosa pálido). Los tubos se enfriaron y a 1 ml de las muestras se les agregó 1 ml de ciclohexanona (Baker). Se centrifugaron las muestras a 2 500 x g/10 min a 4°C y los sobrenadantes se leyeron espectrofotométricamente a 550 nm y a 533 nm. La cuantificación del AS se hizo aplicando la fórmula:

$$\mu\text{moles de AS} = 0.90 \times \text{DO}_{550} - 0.033 \times \text{DO}_{533}$$

Los resultados se expresaron como porcentaje de ácido siálico liberado por la neuraminidasa, en relación a los fantasmas control.

Material y Métodos

emplearon fantasmas control y a los que se agregaron concentraciones conocidas de asbesto.

Determinación de AS: Esto se hizo de acuerdo al método del ácido tiobarbitúrico (90). Las determinaciones se hicieron tanto en el sobrenadante como en el botón de una suspensión de fantasmas previamente tratados con la neuraminidasa y centrifugados a 2 500 x g/10 min a 4°C. A cada fracción (200 µl) se le agregaron 100 µl de periodato de sodio (Laitz) 0.2 M en ácido fosfórico (Merck) 9 N y se incubó por 20 min a 22°C. Posteriormente se agregó 1 ml de arsenito de sodio (Baker) al 10% en sulfato de sodio (Merck) 0.5 M, ácido sulfúrico (Merck) 0.1 N y se agitaron hasta que desapareció el color formado (café). Se agregaron 3 ml de ácido tiobarbitúrico (Sigma) 0.6% en sulfato de sodio 0.5 M. Se pusieron las muestras en agua hirviendo durante 15 min para desarrollar color (rosa pálido). Los tubos se enfriaron y a 1 ml de las muestras se les agregó 1 ml de ciclohexanona (Baker). Se centrifugaron las muestras a 2 500 x g/10 min a 4°C y los sobrenadantes se leyeron espectrofotométricamente a 550 nm y a 533 nm. La cuantificación del AS se hizo aplicando la fórmula:

$$\mu\text{moles de AS} = 0.90 \times \text{DO}_{550} - 0.033 \times \text{DO}_{533}$$

Los resultados se expresaron como porciento de ácido siálico liberado por la neuraminidasa, en relación a los fantasmas control.

Electroforesis en Geles de Poliacrilamida-SDS de los Fantasma de Eritrocitos Expuestos a Asbesto

Muestras: Se prepararon muestras de fantasmas con y sin asbesto (5 mg de proteína/ml) para ser tratadas con Tritón X-100 al 0.1% durante 10 min a 37°C. Al término de la incubación, las muestras se centrifugaron a 2 500 x g/10 min a 4°C. Una vez separados los botones y los sobrenadantes, se dializaron independientemente (exclusión nominal de 3 000) contra Tris - HCl 10 mM, pH 7.4 durante 18 horas a 4°C. Comparativamente se trabajó con fantasmas control y expuestos a asbesto que no fueron tratados con Tritón X-100.

Electroforesis: Las electroforesis se corrieron con muestras de 100 µg de proteína que fueron previamente hervidas por un minuto en un volúmen igual de una mezcla de: Tris-HCl 0.0625 M, pH 7.8; glicerol (Baker) 10%; β mercaptoetanol (Merck) 5%; SDS 2.3% y azul de bromofenol (Merck) 5%. Se emplearon geles de poliacrilamida (Merck) al 7.5% con una concentración final de Tris-HCl 375 mM, pH 8.8; SDS 0.1%. Los geles se hicieron en tubos de vidrio de 8.0 cm x 0.5 cm. El amortiguador de corrida fue: Tris 0.025 M, glicina (Merck) 0.192 M y SDS 0.1%, pH 8.8. En todos los geles sin muestra se hizo una precorrida por 30 min a 3 mA/gel (aparato de electroforesis Pharmacia GE 2/4, fuente de poder Gelman 38206). Las muestras se corrieron a la misma corriente y se interrumpió la electroforesis cuando el frente se encontró a 5 mm del final del tubo. Los geles se tiñeron con metanol (Merck) 20%, ácido acético (Merck) 10%, azul de Coomassie R-250 (Sigma) al 0.1%, durante 18 horas a 22°C. Después de lavar la solución colorante de los geles con agua destilada, se procedió a desteñir los geles con una mezcla de metanol 20%, ácido acético 10% a 60°C.

Hemólisis de Eritrocitos Expuestos a Asbesto en Presencia de Na, K o Li

Se incubaron eritrocitos lavados ($100 \times 10^6/\text{ml}$) en presencia de asbesto (10.78, 21.56 y 43.12 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en 3 ml de amortiguador de NaCl (Merck), KCl (Merck) o LiCl (Merck), todos ellos a una concentración de 130 mM en Tris-HCl 20 mM, pH 7.4 y con una osmolaridad de 275-277 mOsm/kg. Las incubaciones se hicieron a 37°C/30 min, con agitación moderada. Al término de la incubación las muestras se centrifugaron a 475 x g/10 min a 4°C. El sobrenadante se leyó a 540 nm y los resultados se expresaron como porcentaje de hemólisis en relación a la hemoglobina liberada por eritrocitos incubados con agua destilada.

Estadística

Todos los experimentos se repitieron por lo menos tres veces y los resultados se expresan como promedio \pm desviación estandar. En los casos en que se hicieron comparaciones se emplearon la prueba "t" de Student no pareada para dos colas o la prueba de χ^2 modificada por Yates (91). El valor de p considerado como estadísticamente significativo fue <0.05 .

RESULTADOS

Exposición de Ratas al Polvo de Mexicali

El estudio de los pulmones de las ratas expuestas al polvo de Mexicali permitió determinar que tanto el depósito y distribución de las partículas inhaladas, como la respuesta tisular inicial al polvo, es similar a la observada con otros polvos (29). La microscopía de luz solo demostró la prominencia del punto de bifurcación (1ª Bif) de la primera generación de conductos alveolares después del bronquiolo terminal (BT) en el grupo 3/24. Dicha prominencia se debió a la presencia de células mononucleares de 20-30 μm de diámetro, cuya morfología corresponde a macrófagos alveolares (Fig. 4B). La prominencia de la 1ª Bif se observó rara vez en los animales de los grupos 3/0 y 3/8 y estuvo ausente en los de 3/1 (Fig. 4C). Los animales control nunca la presentaron (Fig. 4A).

El estudio de los tejidos al MEB únicamente demostró la presencia de PM libre en el grupo 3/0 (Fig. 5). Esto fue más notable en los animales fijados por vía vascular (3/0v) que en los fijados por vía aérea (3/0a) (Fig. 6) ($97\% \pm 3.3\%$ vs. $77\% \pm 5.0\%$ de las bifurcaciones con polvo). Al mismo tiempo se vio que las partículas se depositaron preferentemente en la 1ª Bif y en menor proporción penetraron hasta la 2ª Bif ($43\% \pm 23\%$), o permanecieron en los BT ($32\% \pm 7.1\%$) ($p < 0.001$). No se identificaron partículas en los animales control. En el Cuadro II se muestran las diferencias en el número de partículas depositadas en cada región anatómica. El promedio de partículas observadas en la 1ª Bif fue de 4.6 ± 1 , mientras que en los BT y en las 2ª Bif fue de 1.6 ± 0.3 y 1.2 ± 0.6 , respectivamente ($p < 0.05$).

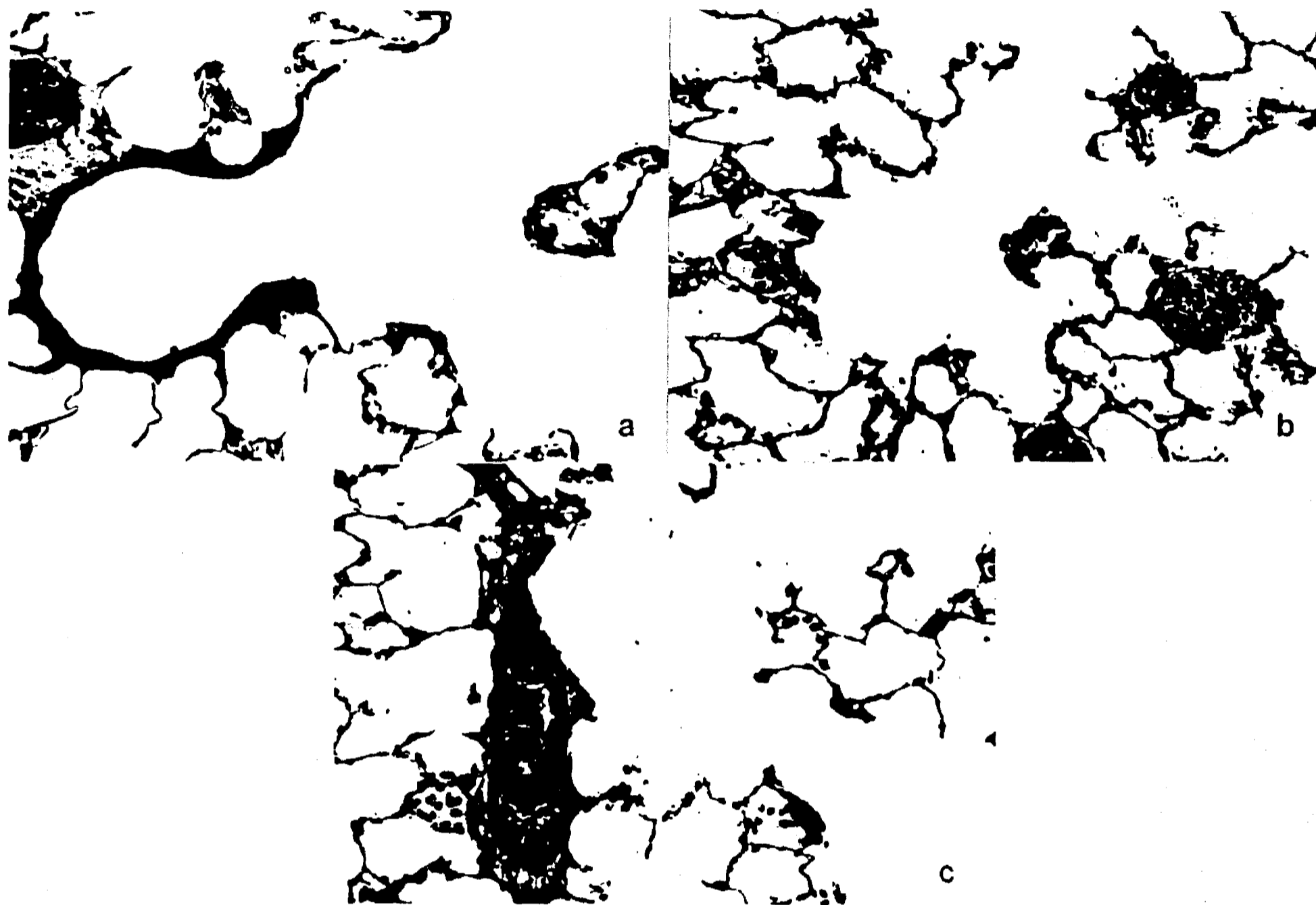


Figura 4. Aspecto al microscopio de luz de las 1^{as} bifurcaciones en los pulmones de ratas control y ratas expuestas al polvo de Mexicali. Rata control (a). Rata expuesta al polvo de Mexicali, 24 horas después de la exposición la bifurcación se observa prominente por la presencia de células mononucleares (b). A los ocho días después de la exposición las bifurcaciones se observan nuevamente sin células (c). (H y E), 240x).

El estudio de los pulmones fijados por vía aérea permitió observar la presencia de células de 20-30 μm con bordes irregulares sobre las células epiteliales de las regiones de depósito del PM (Fig. 7). Esto también ocurrió preferentemente en la 1^a Bif. Se empezó a observar en el grupo 3/0 ($77\% \pm 5\%$), para alcanzar un máximo a las 24 horas ($85\% \pm 6\%$) y disminuir importantemente

Resultados



Figura 5. Punto de bifurcación de un bronquiolo terminal a conductos alveolares en un pulmón de rata expuesta a polvo de Mexicali y sacrificada inmediatamente después. La imagen de electrones secundarios no demuestra claramente las partículas depositadas (a) (MEB, 1 750x). La imagen de electrones retrodispersos (b) identifica claramente a aquellas partículas compuestas por elementos de número atómico mayor al de los tejidos (flecha) (MER, 1 750x).

DISTRIBUCION Y DEPOSITO DEL POLVO DE MEXICALI EN EL PULMON DE RATA

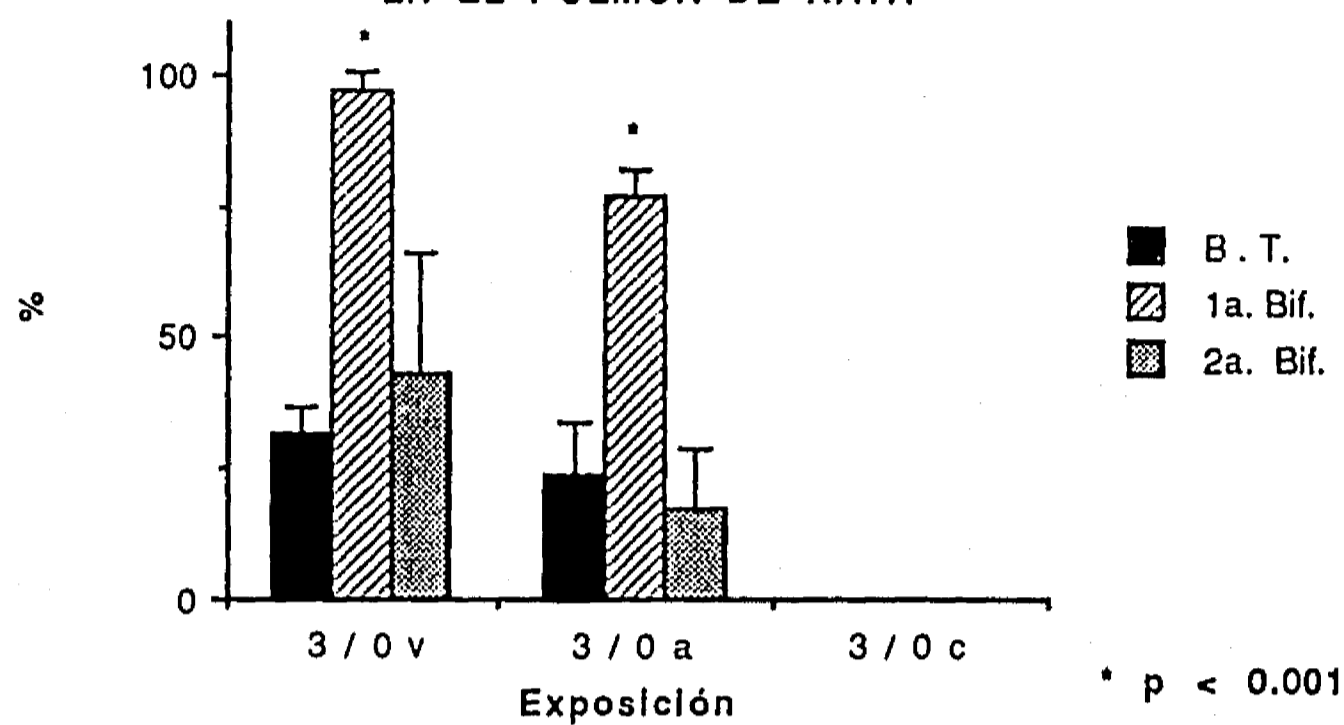


Figura 6. El polvo de Mexicali se depositó preferencialmente a nivel de la 1ª Bif. La fijación de los pulmones por vía vascular es necesaria para preservar a las partículas en el sitio original de depósito. Los animales control no tienen partículas.

CUADRO II

EXPOSICION NASAL A POLVO DE MEXICALI EN RATAS
Distribución y Número de Partículas

t	BT	1a Bif	2a Bif
3/0v	1.6 ± 0.3	4.6 ± 1.0 *	1.2 ± 0.6
3/0a	1.3 ± 0.7	2.4 ± 0.4	0.3 ± 0.3 *
3/0c	0	0	0
3/24	0	0	0
3/8	0	0	0
3/1	0	0	0
3/1c	0	0	0

Número promedio de partículas ± desviación estandar por región anatómica . * p < 0.05

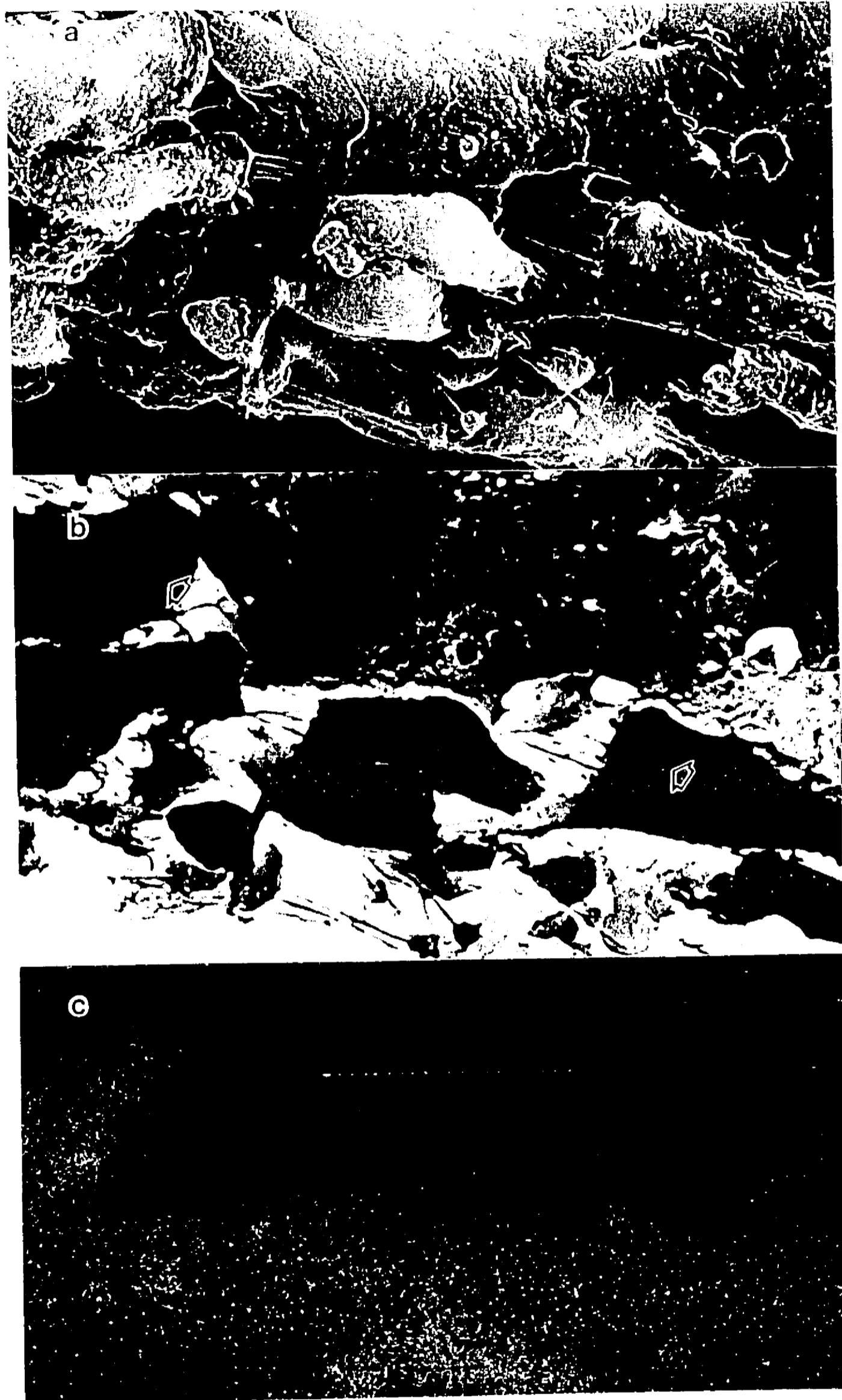


Figura 7. Veinticuatro horas después de la exposición, el MEB permite ver que las 1^{as} bifurcaciones contienen células con un diámetro promedio de 25 μm (a) y en cuyo interior se identifican partículas con ayuda del MER (b), cuya composición es rica en silicio y aluminio de acuerdo al microanálisis de rayos-x (c, mapa de Si) (2 000x).

DISTRIBUCION DE MACROFAGOS EN EL PULMON DE RATA DESPUES DE LA INHALACION DE POLVO DE MEXICALI

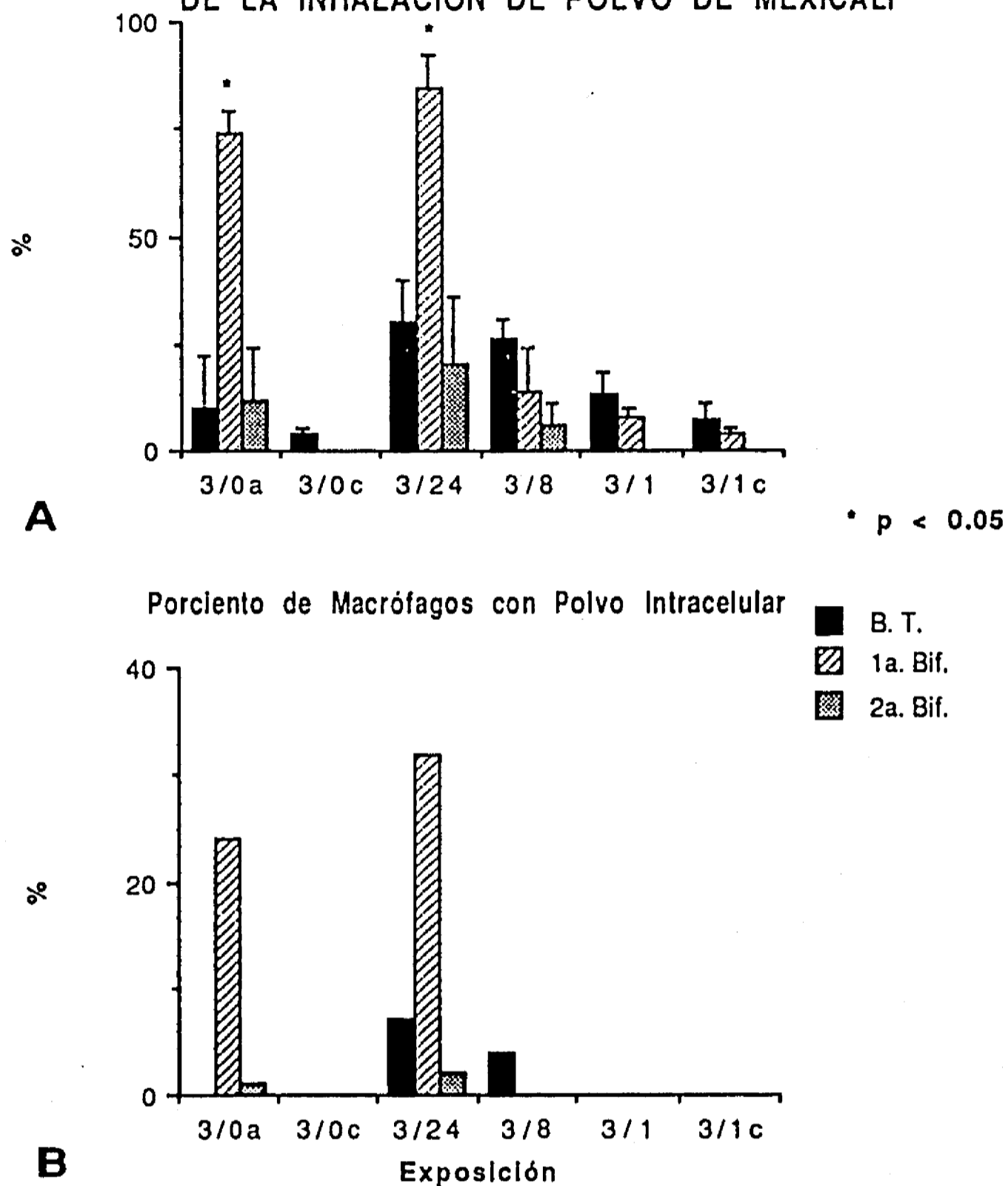


Figura 8. Veinticuatro horas después de la inhalación del PM, la aparición de MA en el sitio de depósito de las partículas se hizo aparente. La 1ª Bif es el sitio con mayor acúmulo de células (A). La identificación de partículas intracelulares fue proporcional al número de MA y nunca sobrepasó 50% (B).

a los ocho días ($14\% \pm 8\%$) y un mes ($8.5\% \pm 3\%$) ($p < 0.05$) (Fig. 8 A y B). En los animales control el porcentaje de 1ª Bif con macrófagos nunca excedió del $4\% \pm 2\%$. El 32% de las células observadas en la 1ª Bif del grupo 3/24 tuvieron PM, mientras que solo el 24% lo tuvieron en 3/0. La distribución de los macrófagos en

Resultados

los bronquiolos terminales y 2^a Bif, demuestra que las células se desplazan hacia los BT a través del tiempo. Simultáneamente persiste un mayor número de células con partículas a este nivel. El número de células por región anatómica en los diferentes grupos, demuestra una movilización inicial de los macrófagos hacia el sitio en que se depositó el polvo de Mexicali y que progresa con el tiempo hacia los bronquiolos terminales (Cuadro III).

CUADRO III

EXPOSICION NASAL A POLVO DE MEXICALI EN RATAS
Distribución y Número de Macrófagos

t	BT	1a Bif	2a Bif
3/0v	0.4 ± 0.4	0	0
3/0a	0.5 ± 0.5	3.5 ± 2.8	0.8 ± 0.8
3/0c	0.5 ± 0.5	0	0
3/24	1.4 ± 0.1	3.3 ± 0.2 **	0.3 ± 0.2
3/8	1.1 ± 0.1 *	0.6 ± 0.2	0.3 ± 0.3
3/1	0.8 ± 0.3	0.7 ± 0.3	0
3/1c	0.5 ± 0.3	0.7 ± 0.5	0

Número promedio de macrófagos ± desviación estandar por región anatómica . * p < 0.005
** p < 0.0005

Actividad Quimiotáctica para Macrófagos Alveolares por Suero Activado con PM

La actividad quimiotáctica se probó con zimosan y asbesto como controles positivos, Fe y S como controles negativos y α-C y PM como problemas. La actividad quimiotáctica a diferentes dosis siempre fue mayor con Z (Fig. 9) El A

ACTIVACION DE SUERO POR PARTICULAS INORGANICAS

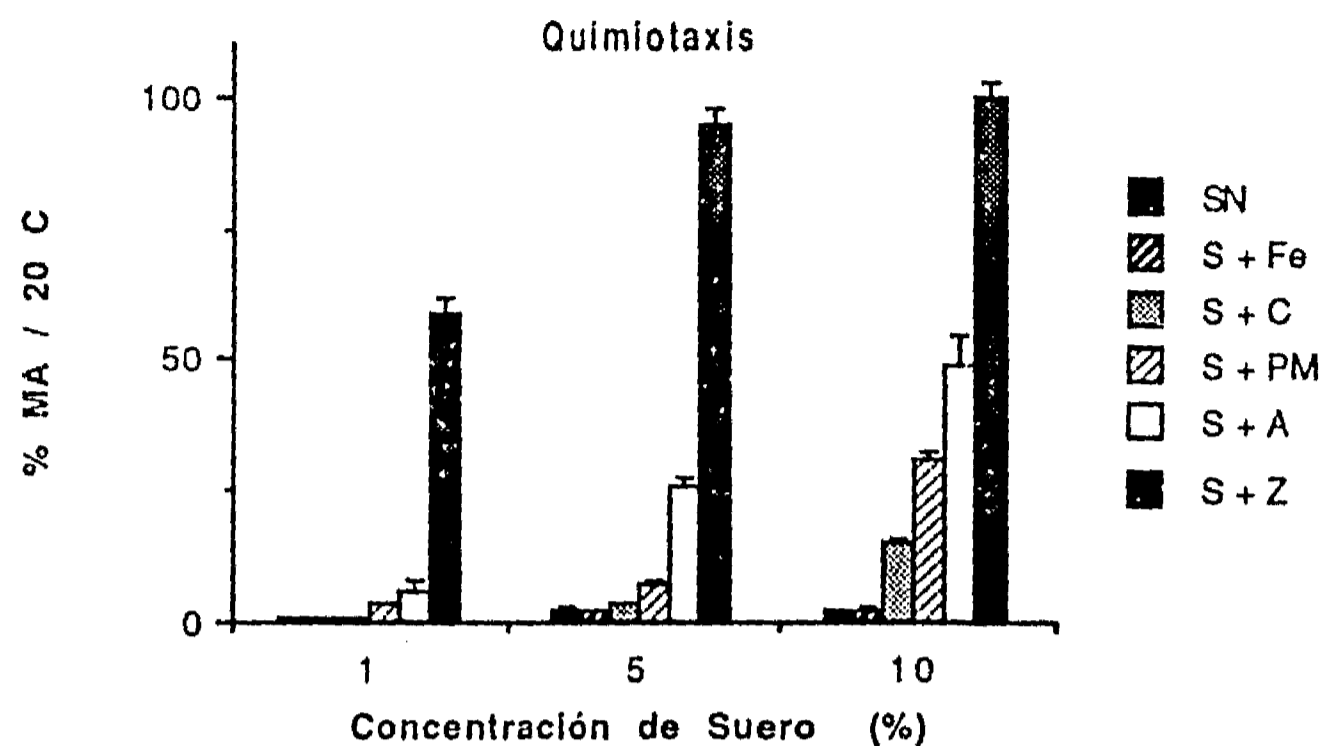


Figura 9. La incubación de partículas inorgánicas con suero normal de rata resultó en grados diversos de activación quimiotáctica, con excepción de las partículas de hierro. La respuesta es dependiente de la concentración de suero empleada.

tuvo una actividad intermedia, seguida por la inducida por el PM y el α C. Tanto el Fe como el suero no indujeron movilidad celular. La concentración óptima de los sueros activados fue del 10%. En los experimentos en que se colocaron las mismas cantidades de suero activado en los compartimentos superiores e inferiores de las cámaras, se demostró que el Z, A y PM provocan una movilidad celular no mayor del 12%. Esta movilidad se encuentra muy por debajo de la inducida contra gradiente (Fig. 10). En el caso de α -C, S y Fe, la movilidad fue igual a la lograda contra gradiente. Cuando se invirtieron los gradientes, prácticamente no existió movilidad celular. Estos resultados indican que la migración inducida por Z, A y PM es una verdadera respuesta quimiotáctica, mientras que la de α -C, Fe y S es quimiocinética. Por otro lado, la incubación de los polvos con suero previamente inactivado, no indujo movilidad celular (respuesta no mayor al 12%) (Cuadro IV).

ACTIVACION DE SUERO POR PARTICULAS INORGANICAS

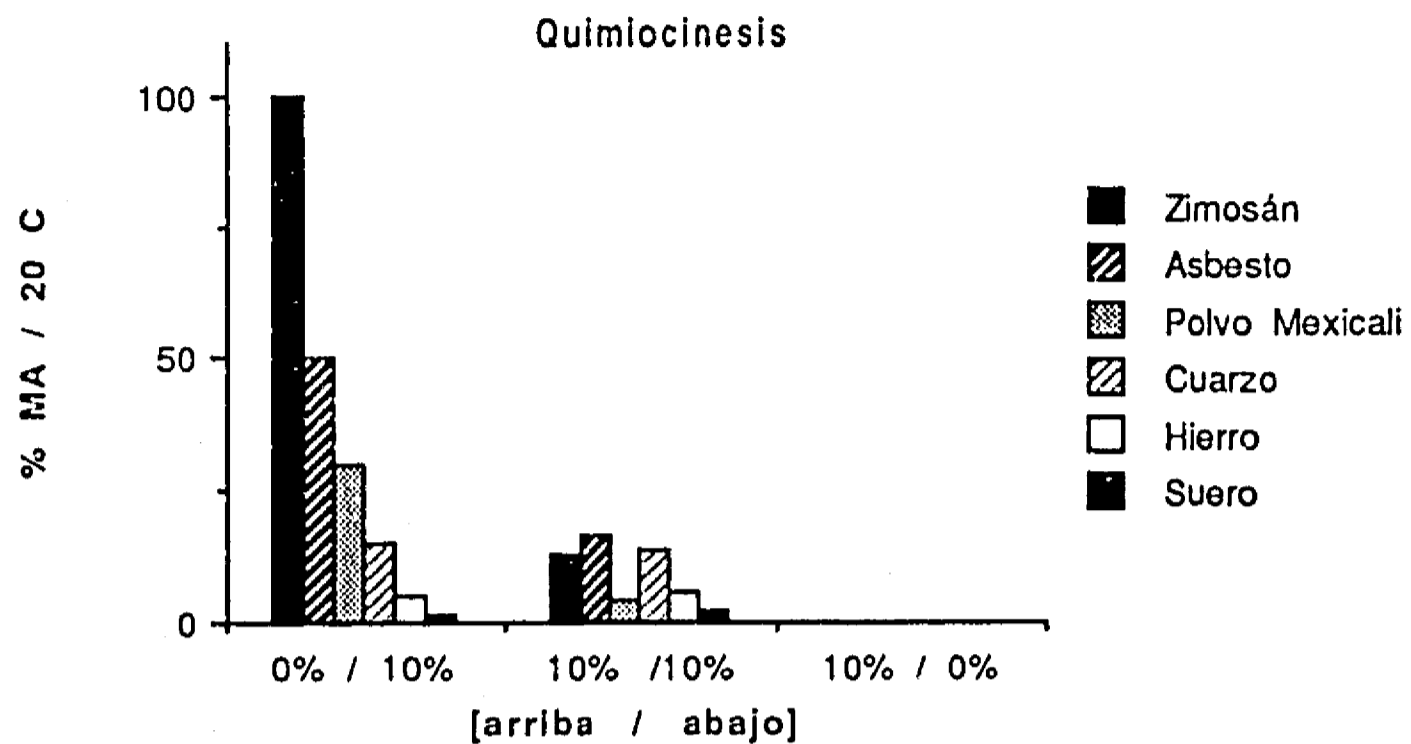


Figura 10. La migración celular inducida por el suero activado con Z, PM y A fue claramente dependiente de la existencia de un gradiente de concentración. La movilidad celular observada cuando se invirtieron o igualaron los gradientes, no fue significativa. Tanto S, como α C, como Fe, no indujeron movilidad dependiente de gradiente.

CUADRO IV

INCUBACION DE PARTICULAS INORGANICAS CON
SUERO INACTIVADO
Quimiotaxis

Polvo	% MA / 20 C
Suero	5 %
Suero + Z	10 %
Suero + PM	9 %
Suero + C	11 %
Suero + A	9 %
Suero + Fe	10 %

Determinación de Complemento en Suero de Rata Activado con Partículas Inorgánicas

La prueba de Mayer demostró actividad promedio de complemento hemolítico en el suero normal (SN) de 17 UCH₅₀ y en suero activado con zimosán (SAZ) de 0 UCH₅₀. De los sueros incubados con los otros polvos, se obtuvo una activación paralela a la observada por quimiotaxis con asbesto (SAA) y polvo de Mexicali (SAPM) ($p < 0.05$). De la misma manera al α C (SA α C) y el Fe (SAFe) no indujeron una activación estadísticamente significativa (Fig. 11), lo que concuerda con la actividad quimiocinética descrita en la sección anterior.

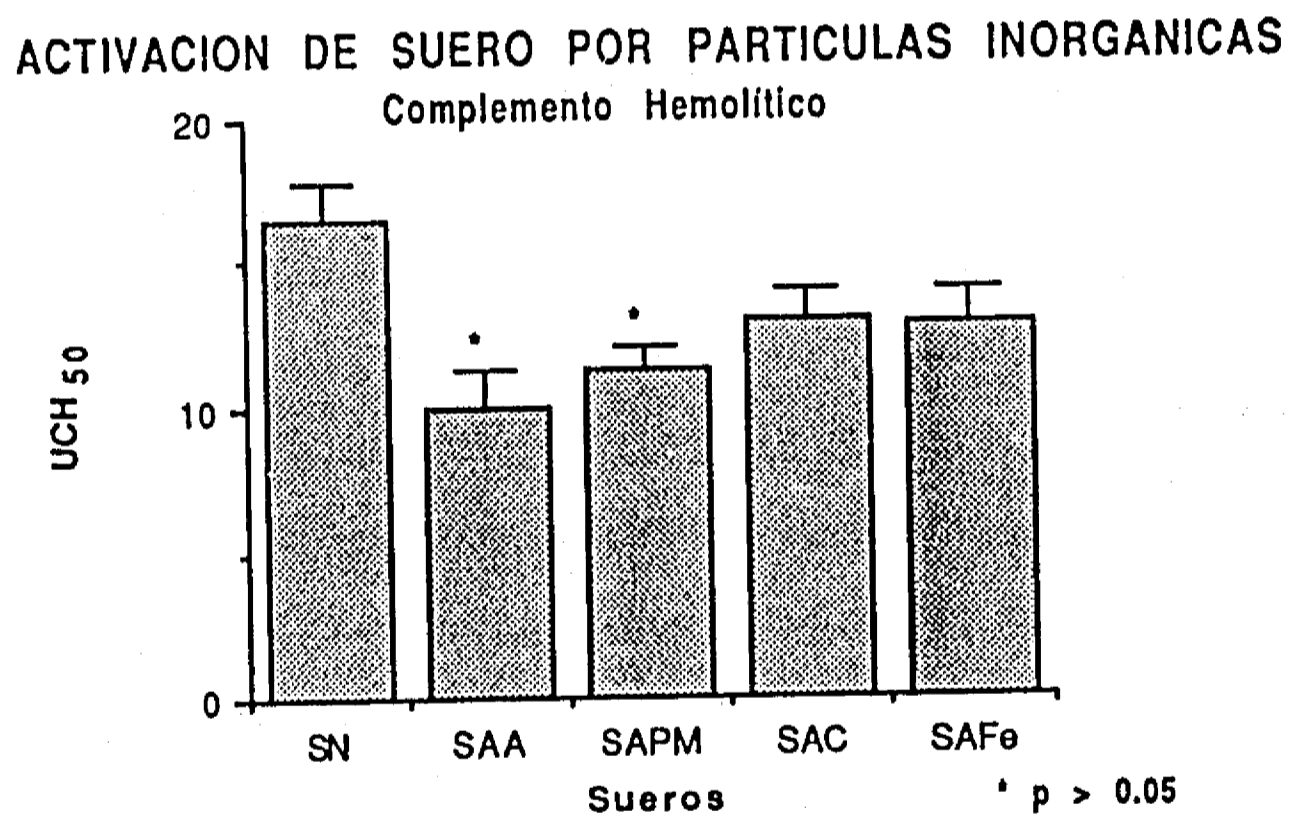


Figura 11. La demostración de activación del complemento en el suero incubado con asbesto y polvo de Mexicali permite sugerir que la actividad quimiotáctica observada con estos sueros, está relacionada con los componentes del complemento.

Determinación de Complemento y Actividad Quimiotáctica para Macrófagos Alveolares en LBA Activado por Partículas Inorgánicas

Doble Inmunodifusión: El anti-C_{3b} obtenido demostró una sola banda de precipitación por doble inmunodifusión, cuando se corrió contra el complejo zimosán-C_{3b}. Esta banda presentó homología con la banda producida contra suero normal de rata (Fig. 12). Cuando el antisuero se probó contra albúmina de

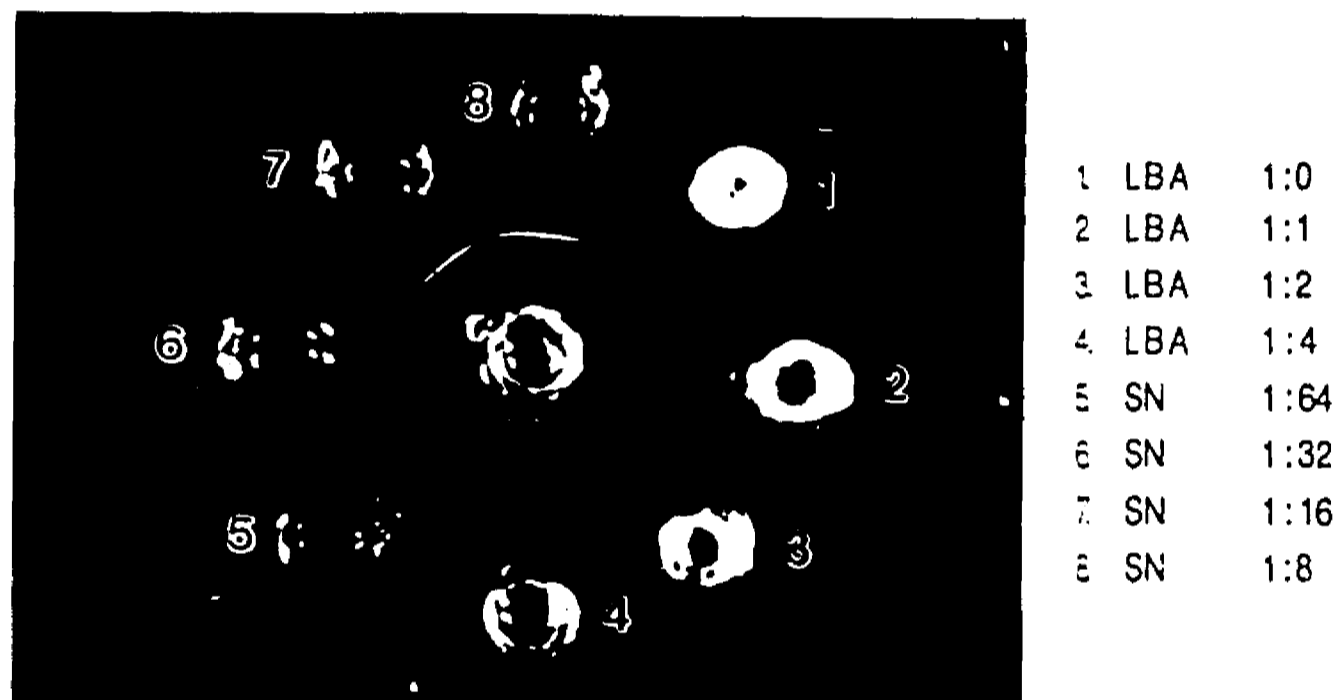


Figura 12. Doble inmunodifusión en la que se observa una sola banda de precipitación y homología entre el suero y el LBA de rata cuando se prueba contra anti C₃.

rata, no se observó precipitación. La menor dilución de LBA con la que se vió precipitación fue de 1:4, mientras que para el suero fue de 1:64.

Prueba de Mayer: Esta prueba también demostró la presencia de complemento en el LBA concentrado. En este caso la cantidad detectada fue 70 veces menor a la del suero y fue posible identificar su activación por Z, PM, α C y A (Fig. 13).

ACTIVACION DE LBA POR POLVOS INORGANICOS

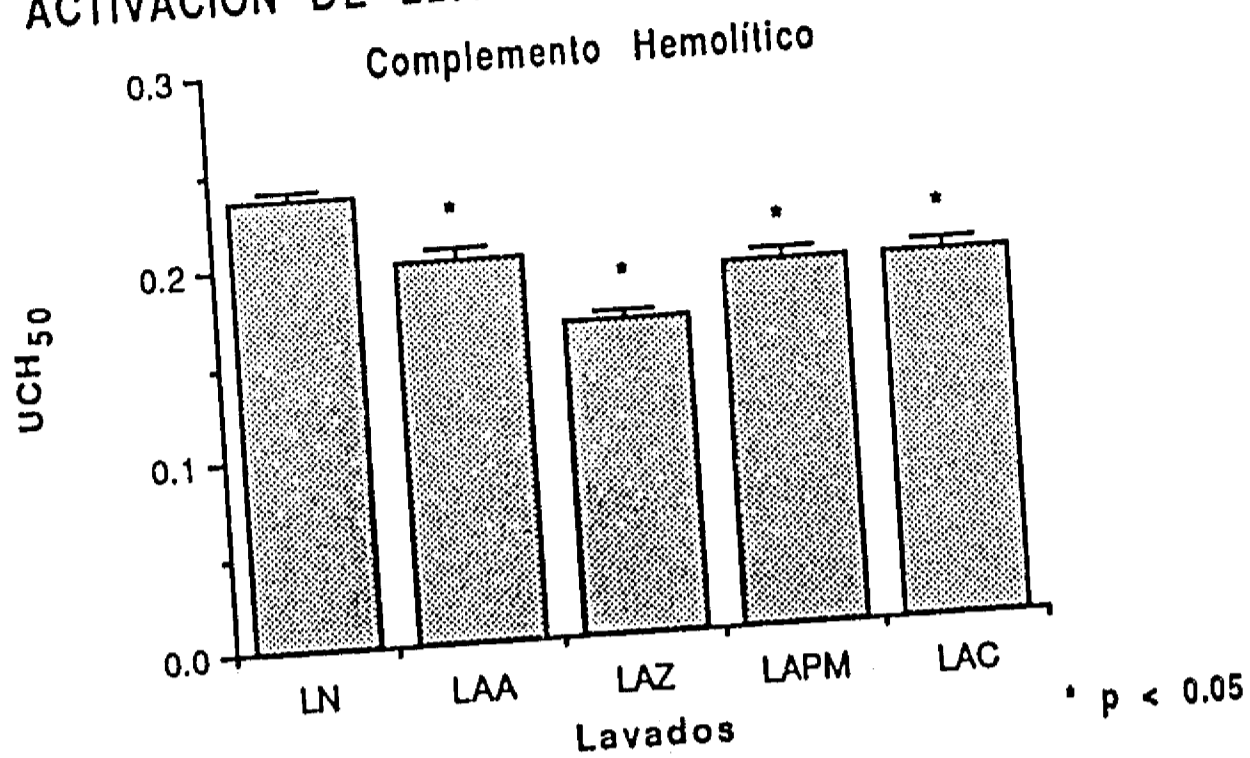


Figura 13. La incubación de las proteínas obtenidas por LBA con asbesto, zimosán, polvo de Mexicali y α -cuarzo, resultó en la activación del complemento presente en las secreciones pulmonares.

Quimiotaxis: Los estudios de quimiotaxis también demostraron activación del LBA concentrado. En este caso la mayor respuesta se obtuvo con zimosán, seguida por asbesto, polvo de Mexicali y α C. La migración celular fue predominantemente contra gradiente, indicando claramente la existencia de un factor quimiotáctico (Fig. 14). Llama la atención que en el caso del α C se indujo respuesta quimiotáctica y no la respuesta quimiocinética observada con el suero, indicando que el cuarzo actúa de manera diferente en el lavado y en el suero. La activación del LBA en presencia de EGTA y EDTA resultó en una inhibición de la migración celular. Esta fue estadísticamente significativa solo cuando se empleó EDTA con Z, A y PM, sugiriendo que el complemento se activa por la vía alterna. Curiosamente en el caso del α C la inhibición por ambos compuestos no fue significativa. El lavado control tuvo una pequeña activación cuya inhibición también fue mínima (Fig.15).

Resultados

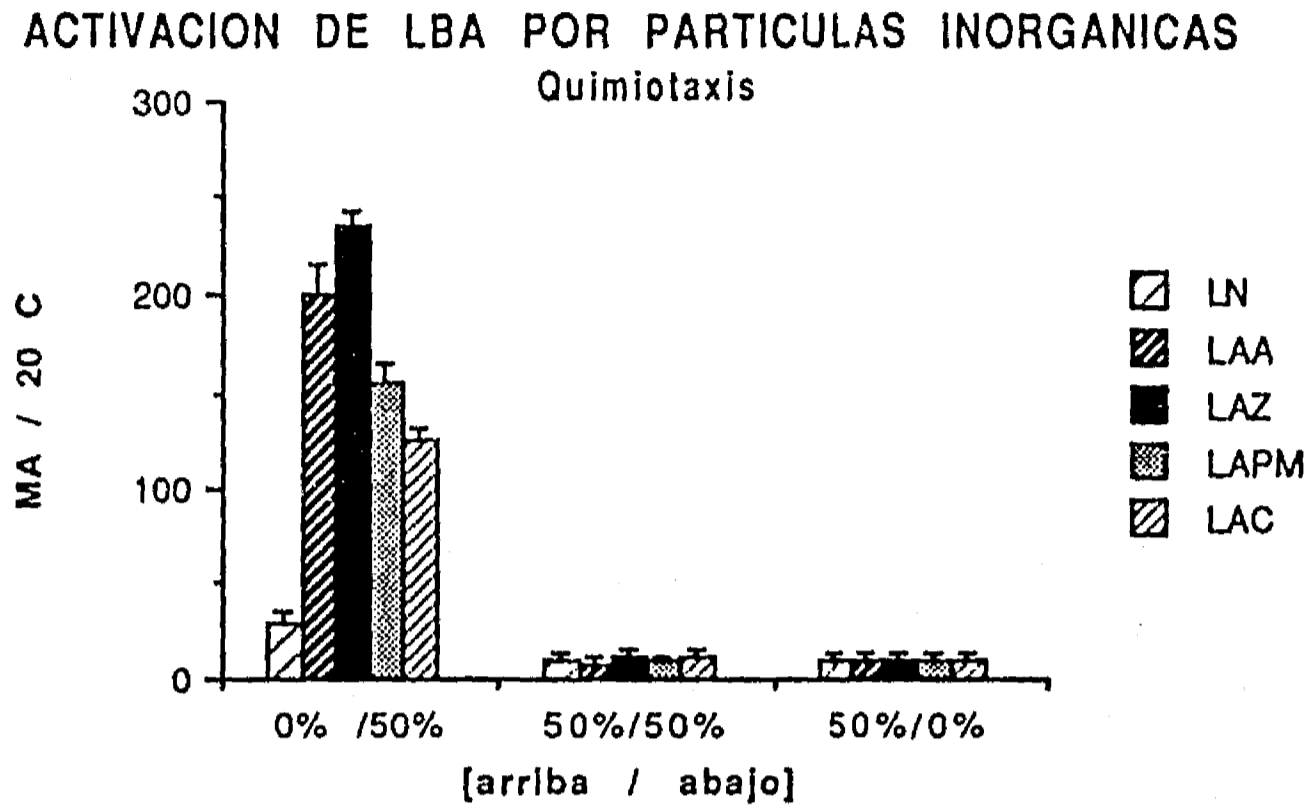


Figura 14. Paralelo a la activación del complemento en el LBA, se identificó actividad quimiotáctica para MA (dependiente de gradiente) con todos los polvos estudiados.

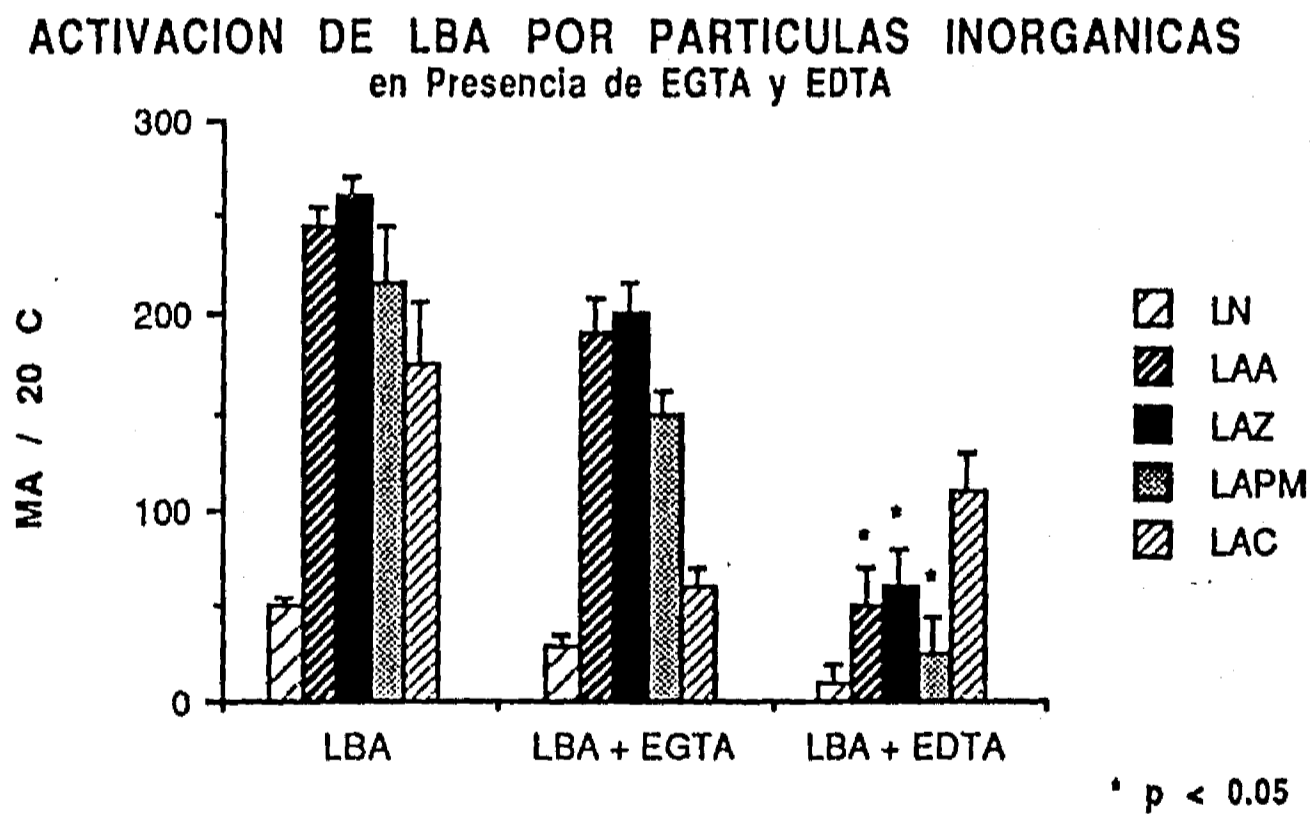


Figura 15. La actividad quimiotáctica observada con el LBA activado con partículas inorgánicas, se vió inhibida cuando se emplearon agentes quelantes de Ca^{++} y Mg^{++} . La mayor inhibición observada con EDTA sugiere que la activación del complemento presente en el LBA ocurre a nivel de la vía alterna. Esto no se aplica en el caso del α cuarzo

Exposición Múltiple a Asbesto

En estos experimentos se identificó la distribución intrapulmonar y la respuesta a la inhalación del asbesto después de exposiciones múltiples (T), en comparación con lo ocurrido después de exposición única (U). En ambos casos el depósito de las fibras fue preferencialmente a nivel de la 1ª Bif (100% de bifurcaciones) (Fig. 16) y tendieron a desaparecer con el tiempo. La comparación entre ambas exposiciones, demostró que en el grupo T existe una mayor penetración de las fibras a la 2ª Bif (62% vs. 41%) ($p < 0.01$) y una mayor permanencia en la 1ª y 2ª Bif a las 24 horas y a los 8 días (Fig. 17 A y B). El número de fibras depositadas y retenidas también fue mayor después de tres dosis. En el caso particular de la 1ª Bif (Cuadro V), en el grupo U/0 el 50%

CUADRO V

EXPOSICION MULTIPLE A ASBESTO
Distribución Semicuantitativa de Asbesto en la 1ª Bif
Promedio Por ciento

	número de fibras			
	0	1 - 3	3 - 6	> 6
U / 0	0	50	17	33
U / 24	49	36	12	3
U / 8	88	12	0	0
T / 0	0	17	43	40
T / 24	41	43	13	3
T / 8	50	42	8	0

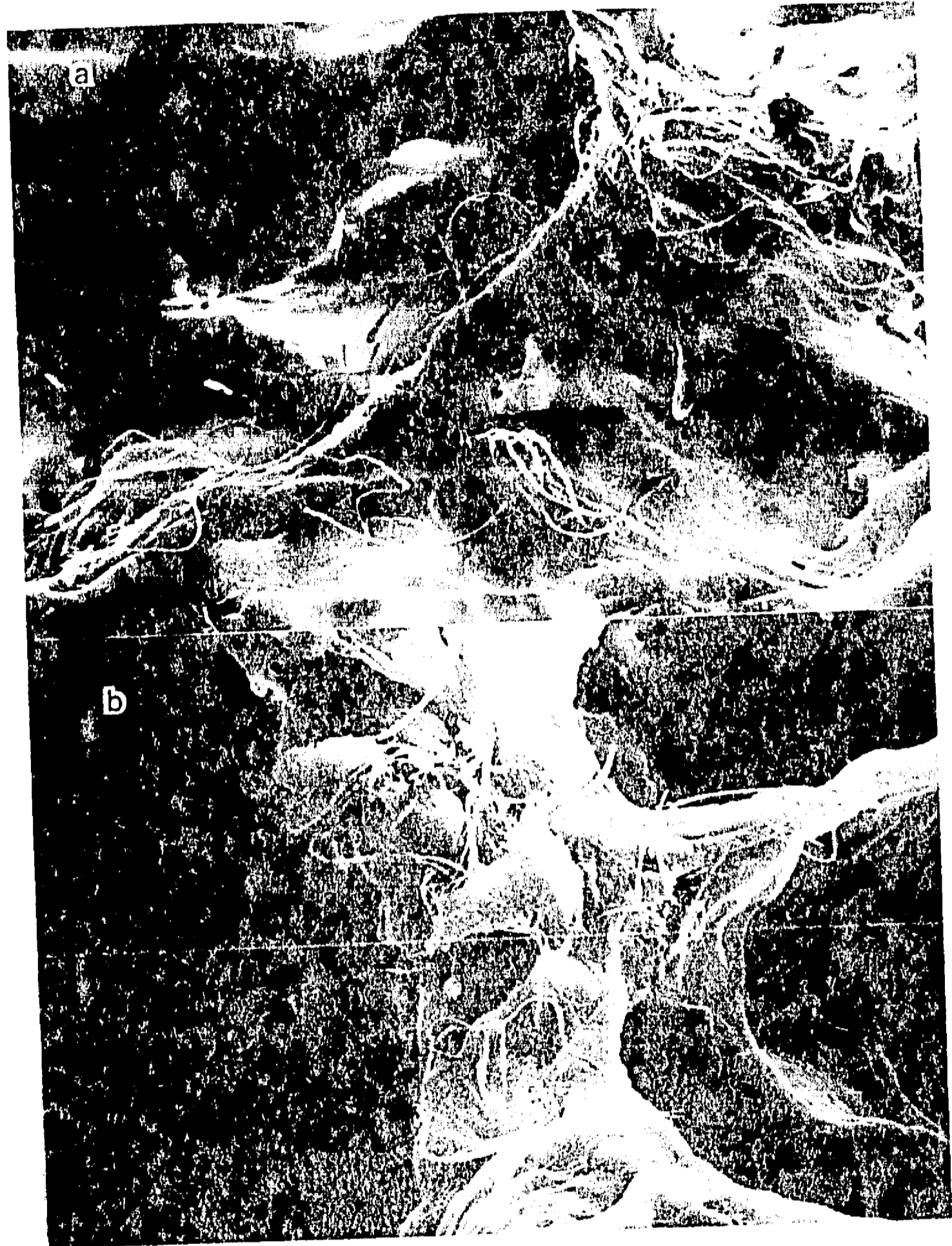


Figura 16. El depósito de las fibras de asbesto en los animales sacrificados al término de la exposición ocurrió a nivel de la 1ª bifurcación después del bronquiolo terminal. Las figuras demuestran comparativamente el depósito inmediatamente después de una dosis (a) (MEB, 2 300x) y después de tres dosis, en donde las fibras coexisten con células que respondieron a las exposiciones anteriores (b) (MEB, 2 00x).

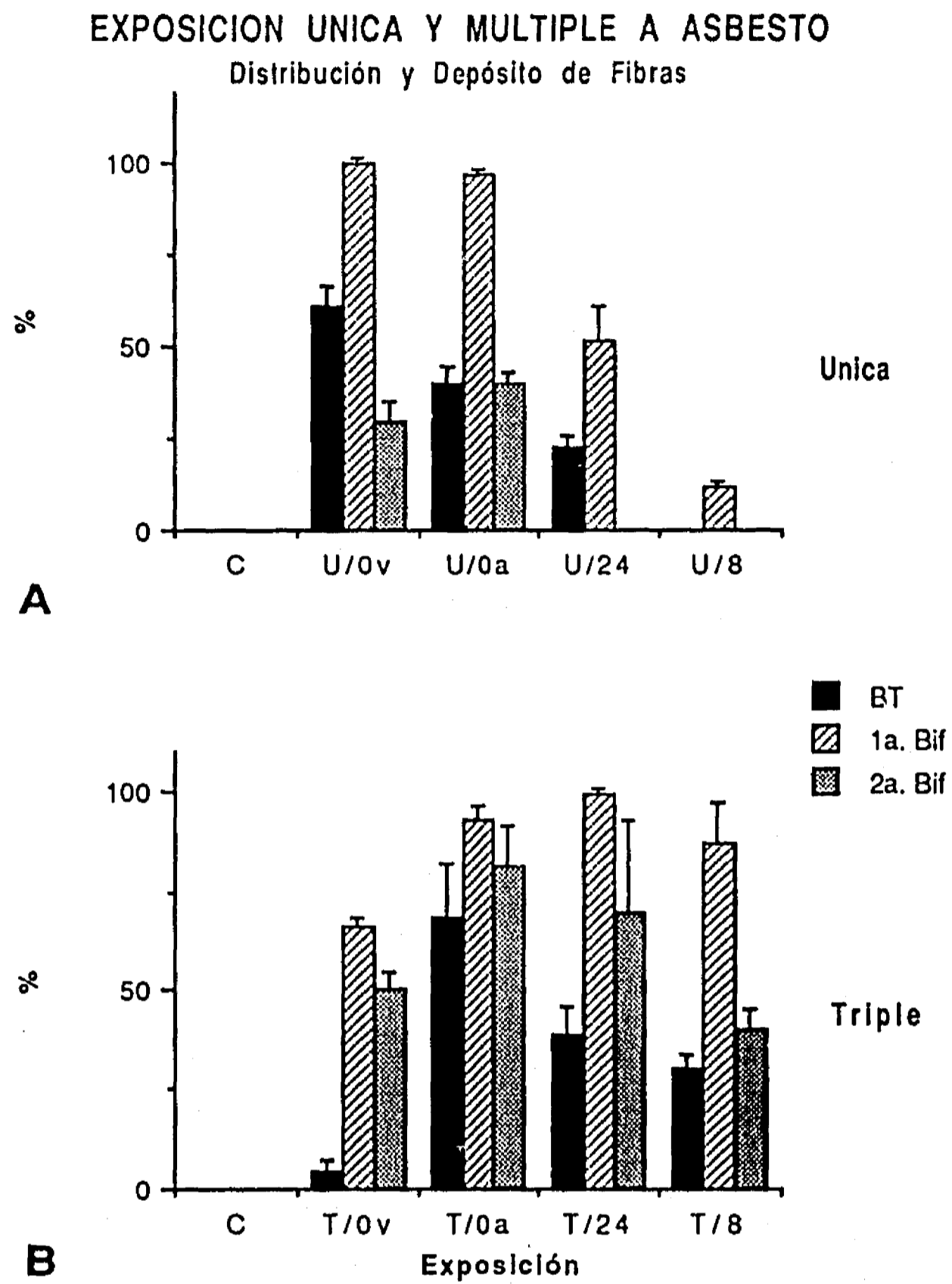


Figura 17. La distribución y depósito de las fibras de asbesto inhaladas después de una (A) o tres dosis (B), ocurre preferencialmente a nivel de la 1ª bifurcación. En el caso de la exposición triple el depósito y permanencia de las fibras es mayor y mas prolongado.

tuvieron de 1-3 fibras/Bif y en el grupo T/O, el 43% tuvo de 3-6 fibras/Bif. La retención de las fibras a lo largo del tiempo también fue mayor en el grupo T. Veinticuatro horas después de la exposición se notó un aumento importante en el número de bifurcaciones a las que migraron células. En el caso de la exposición única alcanzó 88% y en la triple 100%. La exposición triple se caracterizó por la presencia de macrófagos alveolares en 93% de las 1^{as} Bif al tiempo 0, en comparación con 24% en el grupo U/0. Lo mismo sucedió en el nivel de la 2^a Bif y del bronquiolo terminal. Las respuestas celulares a los ocho días fueron mayores en el grupo T (Fig. 18 A y B). El número de MA observados en cada región anatómica fue mayor en el grupo T (Fig. 19). El promedio de células observadas en la 1^a Bif a las 24 horas fue de 5.2 ± 1.1 MA/Bif en U/24 y de 10 ± 1.6 MA/Bif en T/24 ($p < 0.001$) (Fig. 20 A y B). En los animales control nunca se observaron fibras y rara vez se identificaron macrófagos en las bifurcaciones.

En la Fig. 21, Cuadro VI y Figs. 22 A y B se demuestra que la distribución de fibras en los pulmones de los animales sometidos a LBA, es similar a los no lavados y con la misma tendencia a ser mayor en el grupo T (Fig. 21). El número de partículas tendió a disminuir en los animales lavados al tiempo 0, mientras que en U/24 y T/24 se encontraron números similares a los presentes en los pulmones no lavados. La distribución y el número de células se mantuvieron semejantes en los animales lavados y no lavados, con excepción de la pérdida de los macrófagos en los bronquiolos terminales (Fig. 22 A y B).

LBA: La viabilidad y el número de células recolectadas en el LBA no varió en los diferentes grupos de ratas expuestas y el porcentaje de polimorfonucleares nunca pasó del 2%. El número promedio de MA/animal fue para el grupo control de 16×10^6 ; para el grupo U/0 de 15×10^6 ; para el grupo U/24 de 17×10^6 ; para el

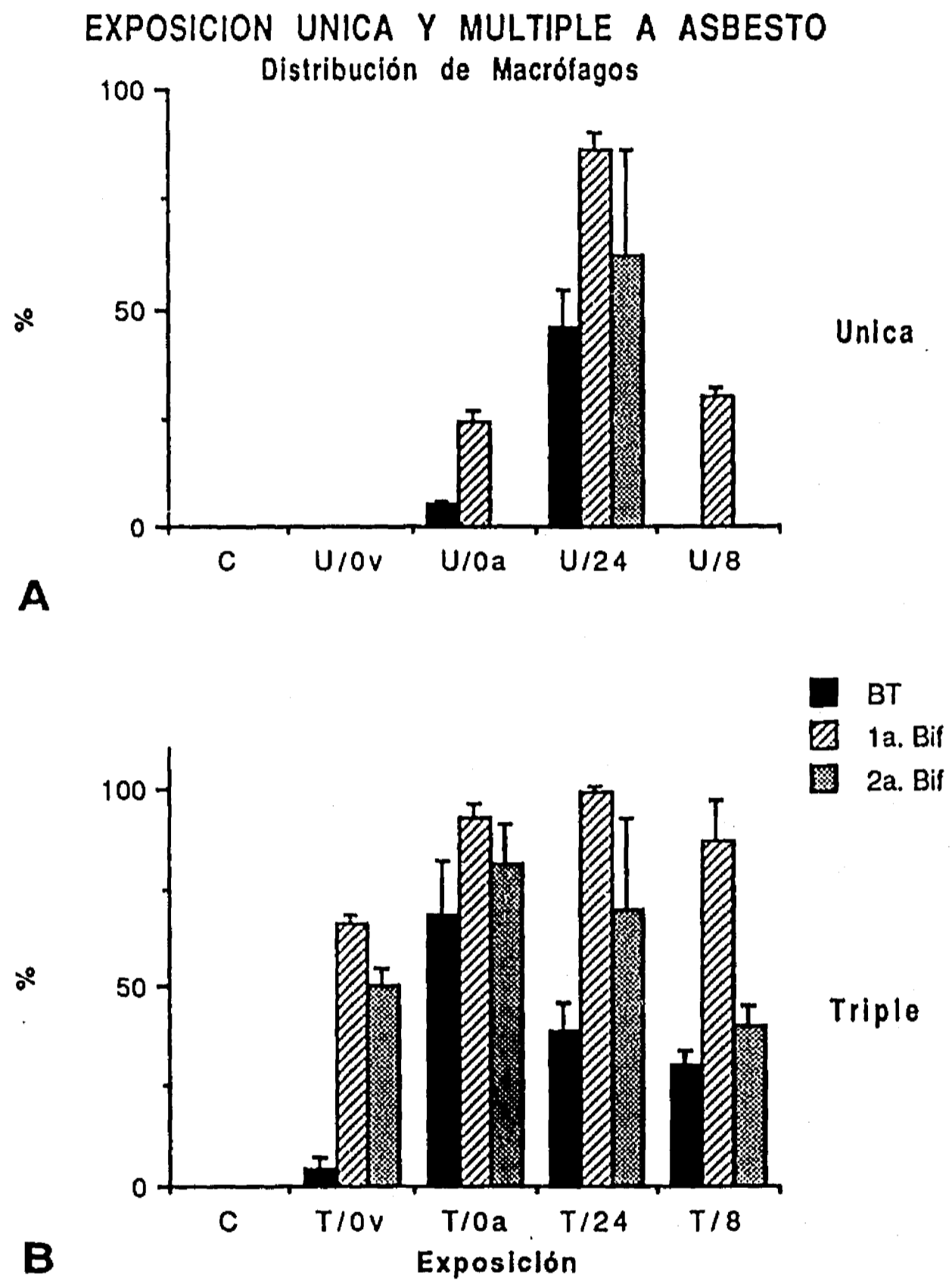


Figura 18. La respuesta macrofágica a las fibras de asbesto retenidas después de una (A) o tres (B) exposiciones, también ocurre preferencialmente en la 1ª bifurcación. Sin embargo, la respuesta celular a tres dosis se extiende y permanece más tiempo a niveles más profundos del acino pulmonar.



Figura 19. Veinticuatro horas después de la última exposición se observó la migración de células al sitio de depósito de las partículas. La dosis única indujo una migración menor (a) (MEB : 000x) que la observada después de tres dosis (b) (MEB, 1 620x).

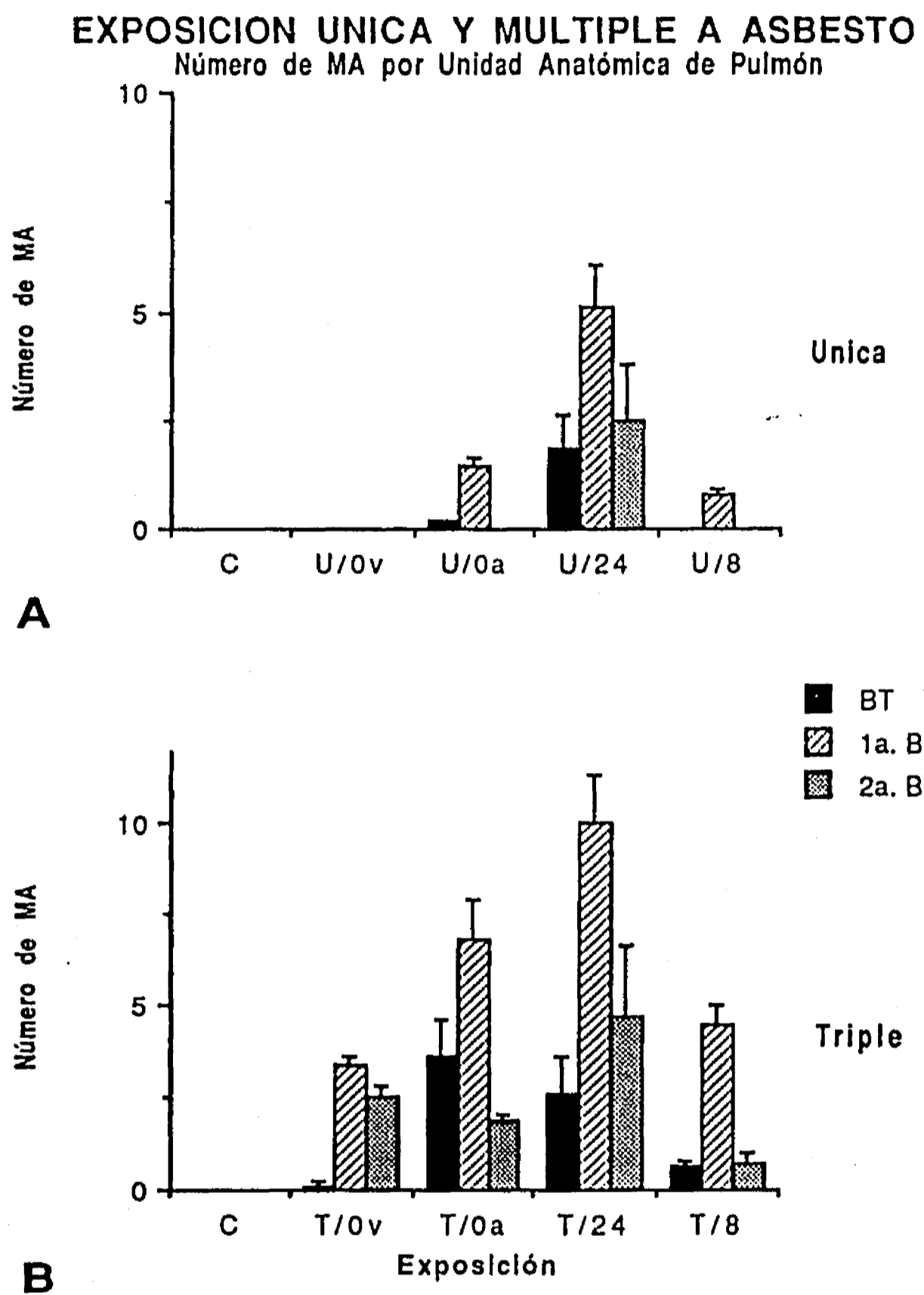


Figura 20. El número de MA observados en las diferentes regiones anatómicas de los pulmones de ratas expuestas a una (A) o tres (B) dosis de asbesto, indica una mayor respuesta celular en esta última.

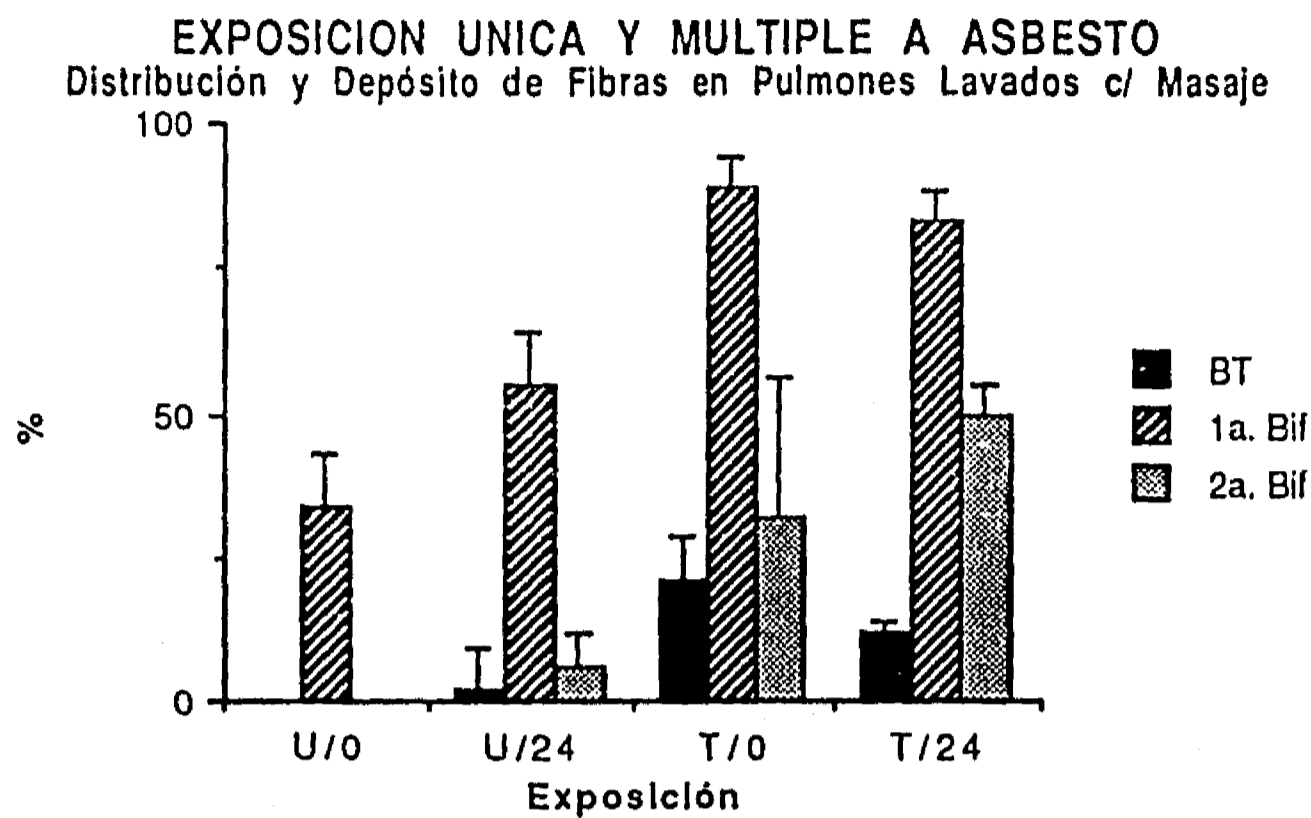


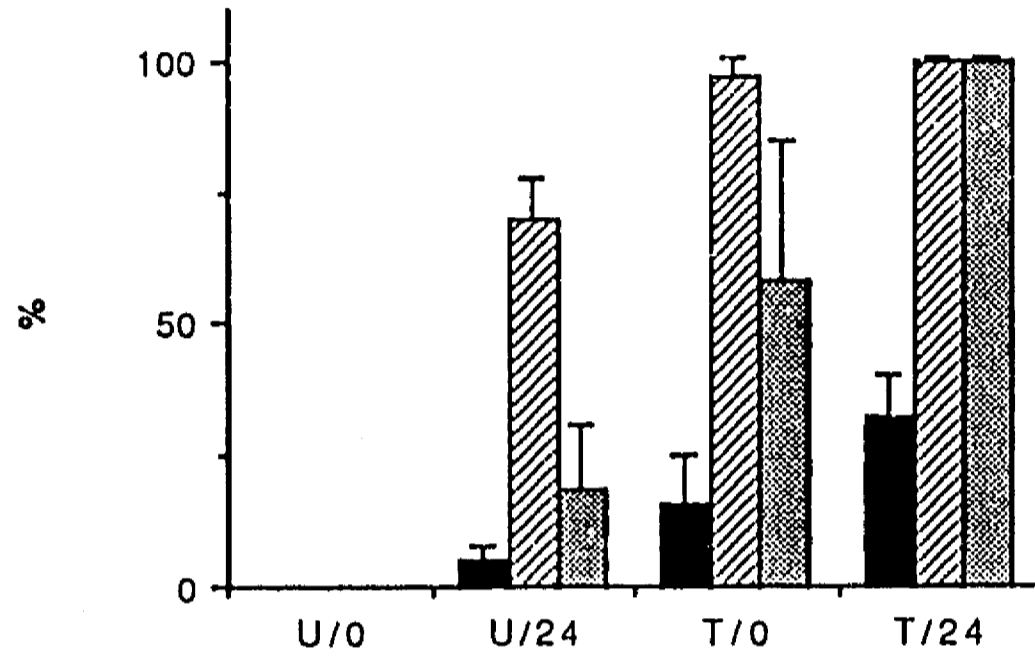
Figura 21 La persistencia de las fibras de asbesto en los sitios de depósito después de LBA en animales expuestos a una (U) o tres (T) dosis, indica una fuerte interacción partícula célula. Esta puede ser responsable de la progresión del daño pulmonar inducido por asbesto.

CUADRO VI

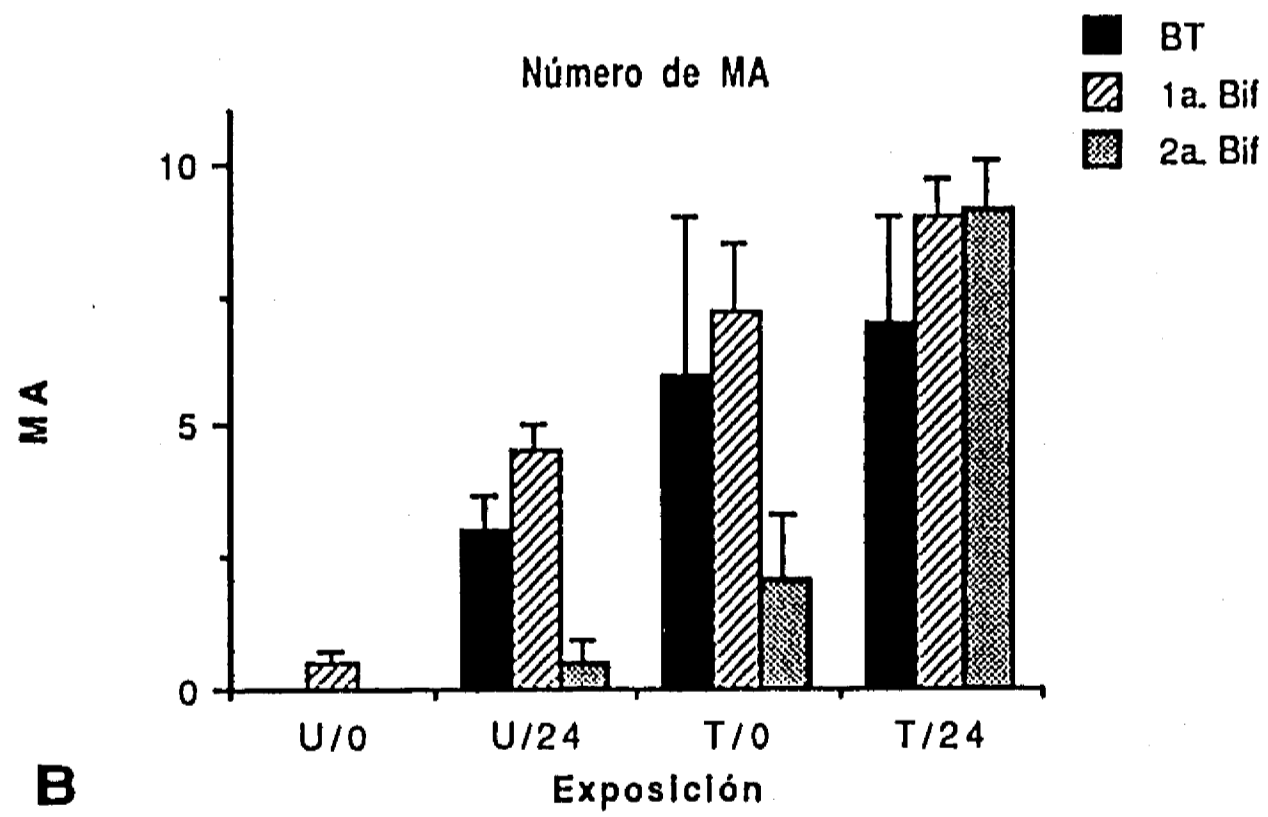
EXPOSICION MULTIPLE A ASBESTO
Distribución Semicunatitativa de Asbesto en la 1ª Bif
Pulmones Lavados c/ Masaje
Promedio Por ciento

	número de fibras			
	0	1 - 3	3 - 6	> 6
U / 0	65	18	17	0
U / 24	45	41	12	2
T / 0	11	42	32	14
T / 24	17	52	20	11

EXPOSICION UNICA Y MULTIPLE A ASBESTO
 Distribución de Macrófagos Alveolares en Pulmones Lavados c/ Masaje



A



B

Figura 22. Además de que el LBA no fue capaz de remover las fibras de asbesto depositadas, tampoco modificó la distribución (A) y el número (B) de MA que migraron al sitio de depósito de las partículas. La única excepción en ambos casos fue la eliminación de fibras y células presentes a nivel de los bronquiolos terminales.

Resultados

grupo T/0 de 13×10^6 y para el grupo T/24 de 14×10^6 . Por otro lado, el número de macrófagos que fagocitaron asbesto aumentó en relación a la dosis y al tiempo después de la exposición (Cuadro VII).

CUADRO VII

CULTIVO EN MONOCAPA DE MA
Porcentaje de MA con Asbesto *

Exposición	%
U/0	10
U/24	20
T/0	25
T/24	35

* 100 MA a 20 kV

La actividad quimiotáctica encontrada en las fracciones de los LBA concentrados siempre fue mayor en las alícuotas que se calentaron a $56^{\circ}\text{C}/45$ min (Figs. 23 A y B). Dicha actividad se presentó tanto en la fracción de corte nominal >10 kDa como en la >25 kDa. De éstas, la mayor actividad en todos los grupos ocurrió en la >10 kDa, empezando a observarse en el grupo U/0 para alcanzar un pico en U/24 y disminuir progresivamente en T/0 y T/24 (Fig. 23 A). En el caso de la fracción >25 kDa, la mayor actividad ocurrió en el grupo T/24, seguida por U/24 y en menor grado por U/0 y T/0 (Fig. 23 B). Esto indica que existe actividad quimiotáctica en ambas fracciones estudiadas y que varían en relación al tipo de exposición.

EXPOSICION UNICA Y MULTIPLE A ASBESTO
Quimiotaxinas en LBA

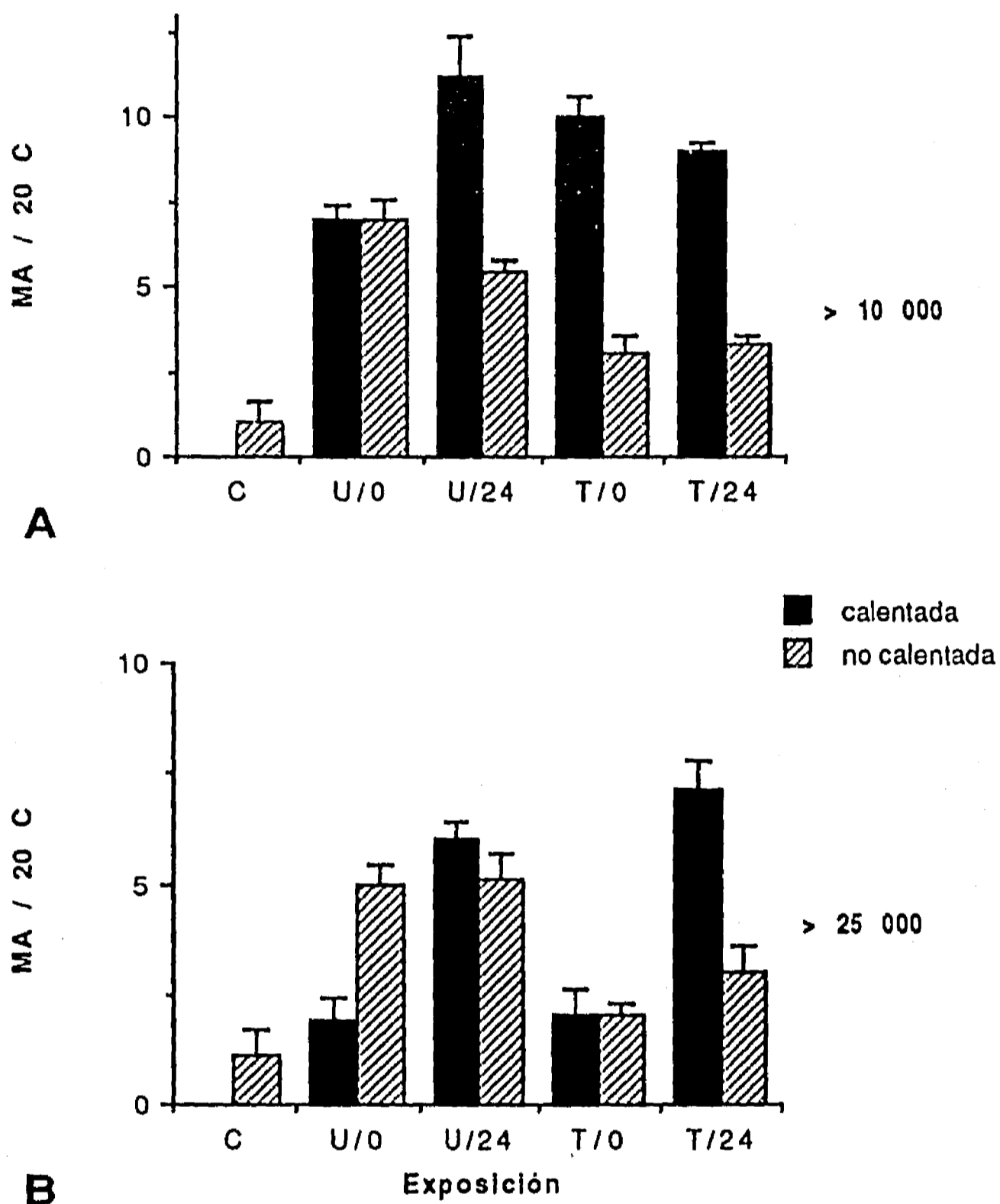


Figura 23. La búsqueda de sustancias quimiotácticas para MA presentes en el LBA de ratas expuestas una y tres veces a asbesto, permitió identificar dicha actividad en fracciones con pesos moleculares >10 000 (A) y >25 000 (B). La incubación de las fracciones a 56°C/1 hr. permitió observar una mayor respuesta. El desfase en tiempo de la actividad observada con las fracciones >10 000 y >25 000, sugiere la participación en el proceso de más de un factor quimiotáctico.

Exposición de Eritrocitos a Asbesto

Hemólisis: Se observaron distintos grados de hemólisis dependientes de la dosis de asbesto empleada (Fig. 24). A partir de la dosis de 10.78 $\mu\text{g/ml}$ se

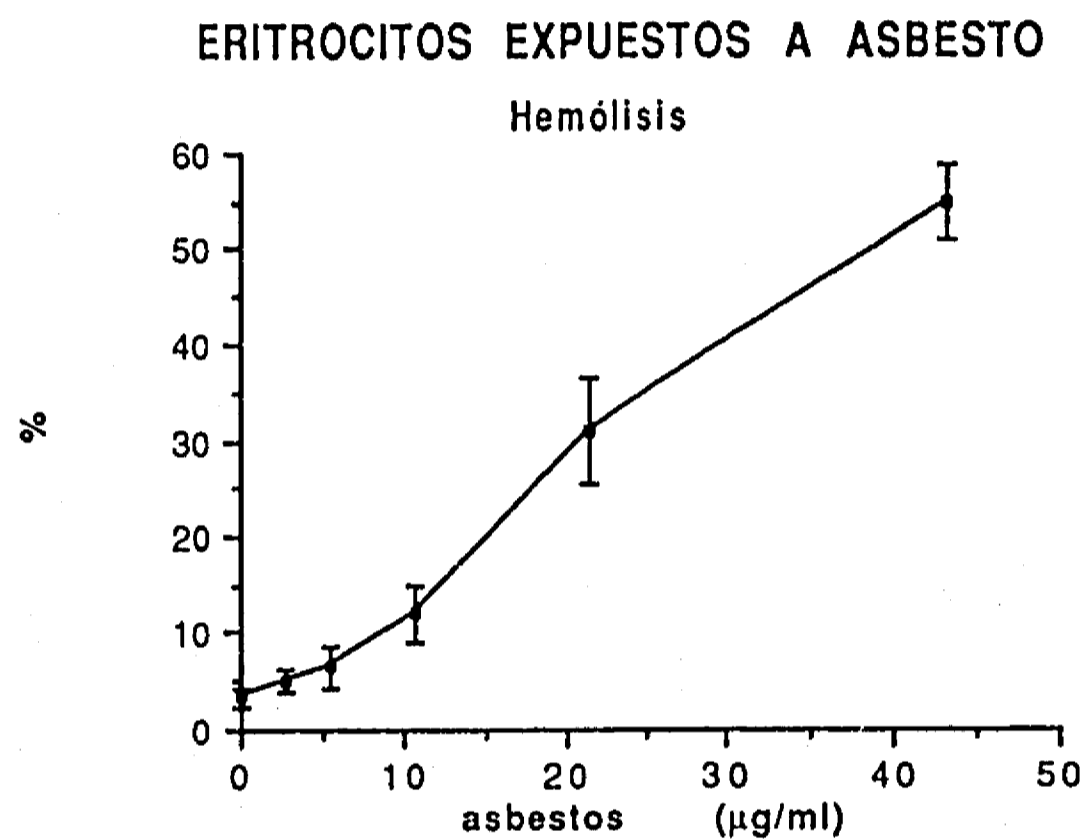


Figura 24. La exposición de eritrocitos humanos a diferentes dosis de asbesto resulta en grados progresivos de hemólisis a partir de 10.78 $\mu\text{g/ml}$ de asbesto crisotilo.

empezó a ver un grado de lisis del 12%, para alcanzar una lisis máxima del 55% con la mayor dosis de asbesto. El estudio morfológico de las células expuestas demostró la deformación de los eritrocitos (Fig. 25). La observación de los fantasmas resultantes con MET, permitió corroborar la adherencia de las fibras a las membranas (Fig. 26).

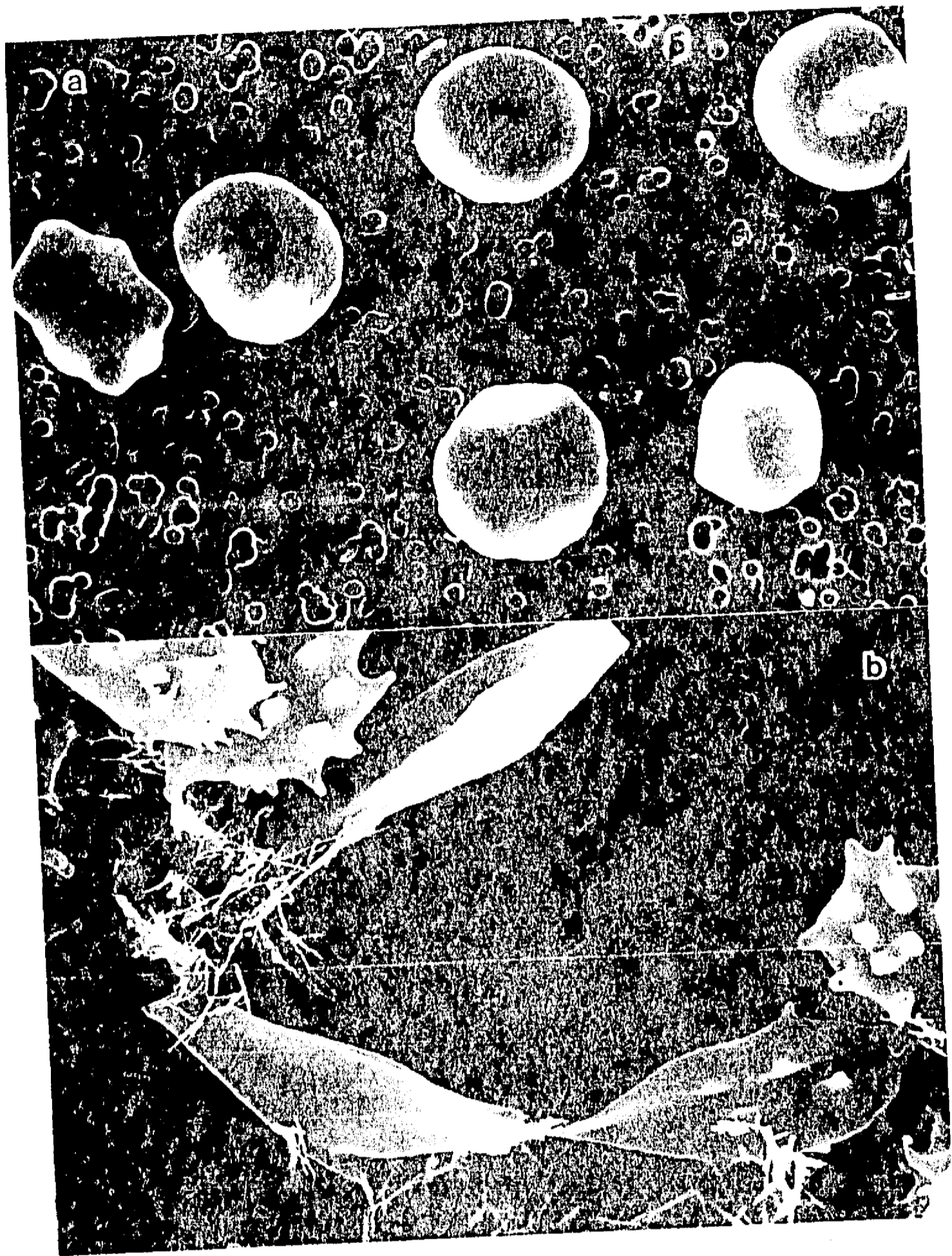


Figura 25. Aspecto al MEB de los eritrocitos control y de los eritrocitos expuestos a asbesto. (a) eritrocitos control (4 140x). (b) eritrocitos deformados por el asbesto (4 935x).

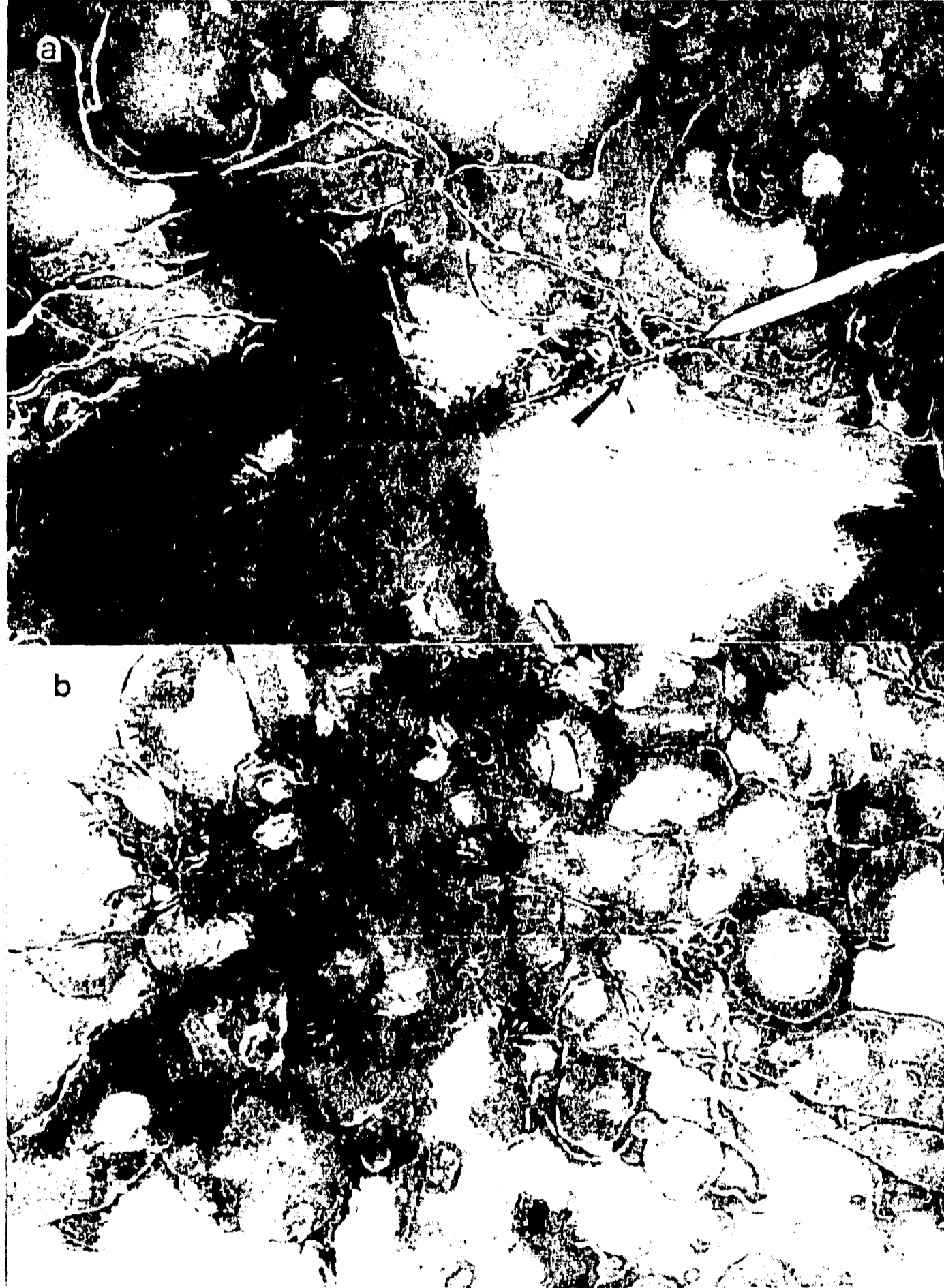


Figura 26. El microscopio de transmisión permitió observar la interacción de las fibras con las membranas de los eritrocitos (a) (923 000x). En (b) se observan las membranas no expuestas a asbesto (14 400x) (tinción negativa).

Actividad de las ATPasas de $[Na^+, K^+]$ y de $[Ca^{++}, Mg^{++}]$ en Fantasma de Eritrocitos Expuestos a Asbesto:

El asbesto no produjo interferencia con los métodos empleados para la determinación de proteína (Fig. 27) o de P_i (Fig. 28). Tampoco se observó que el asbesto afectara la disponibilidad del ATP presente en las mezclas de reacción (Cuadro VIII).

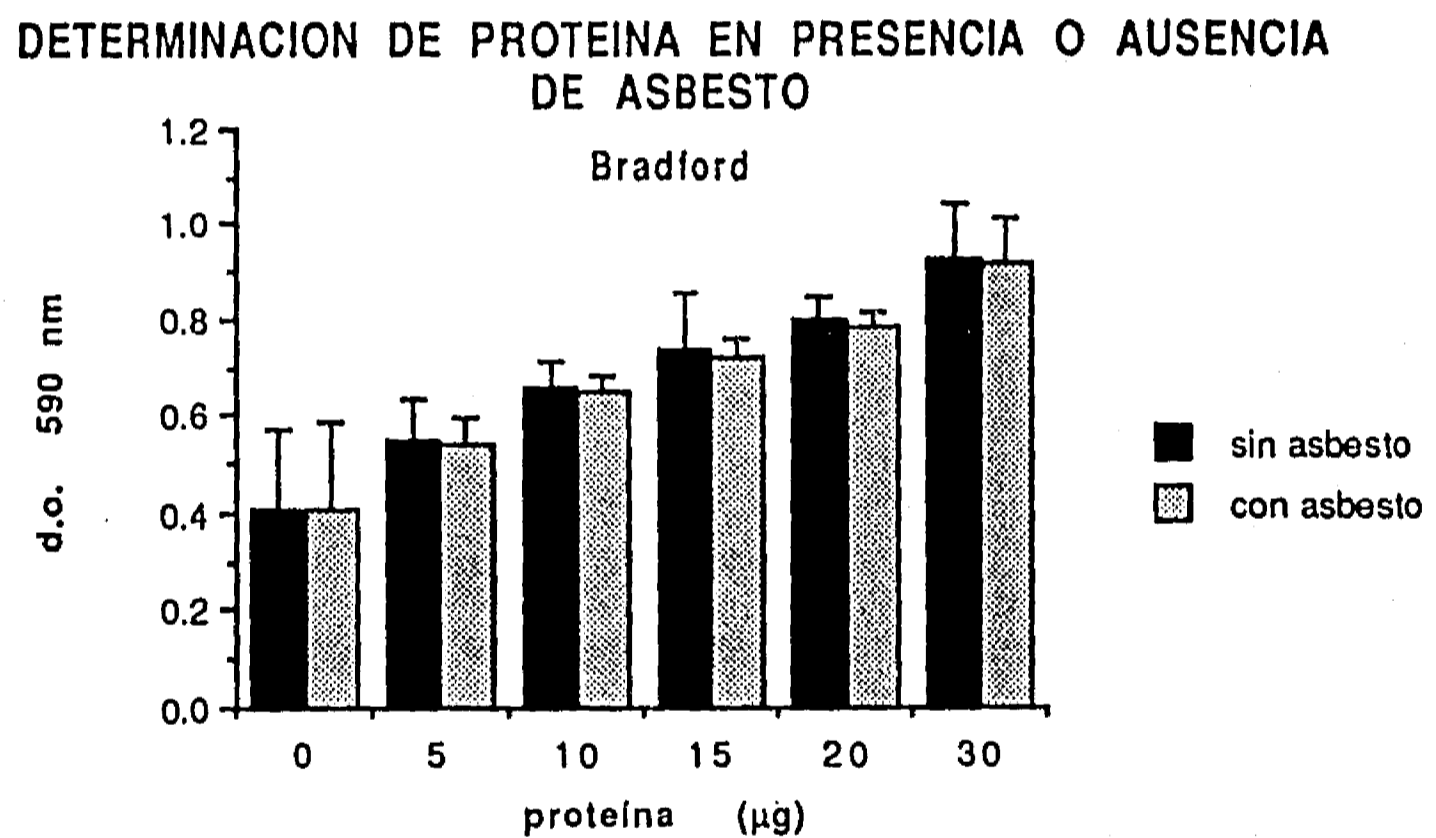


Figura 27. La presencia de la dosis mayor de asbesto empleada en estos experimentos ($43.12 \mu g/ml$), no interfiere en el sistema empleado para cuantificar proteína.

Resultados

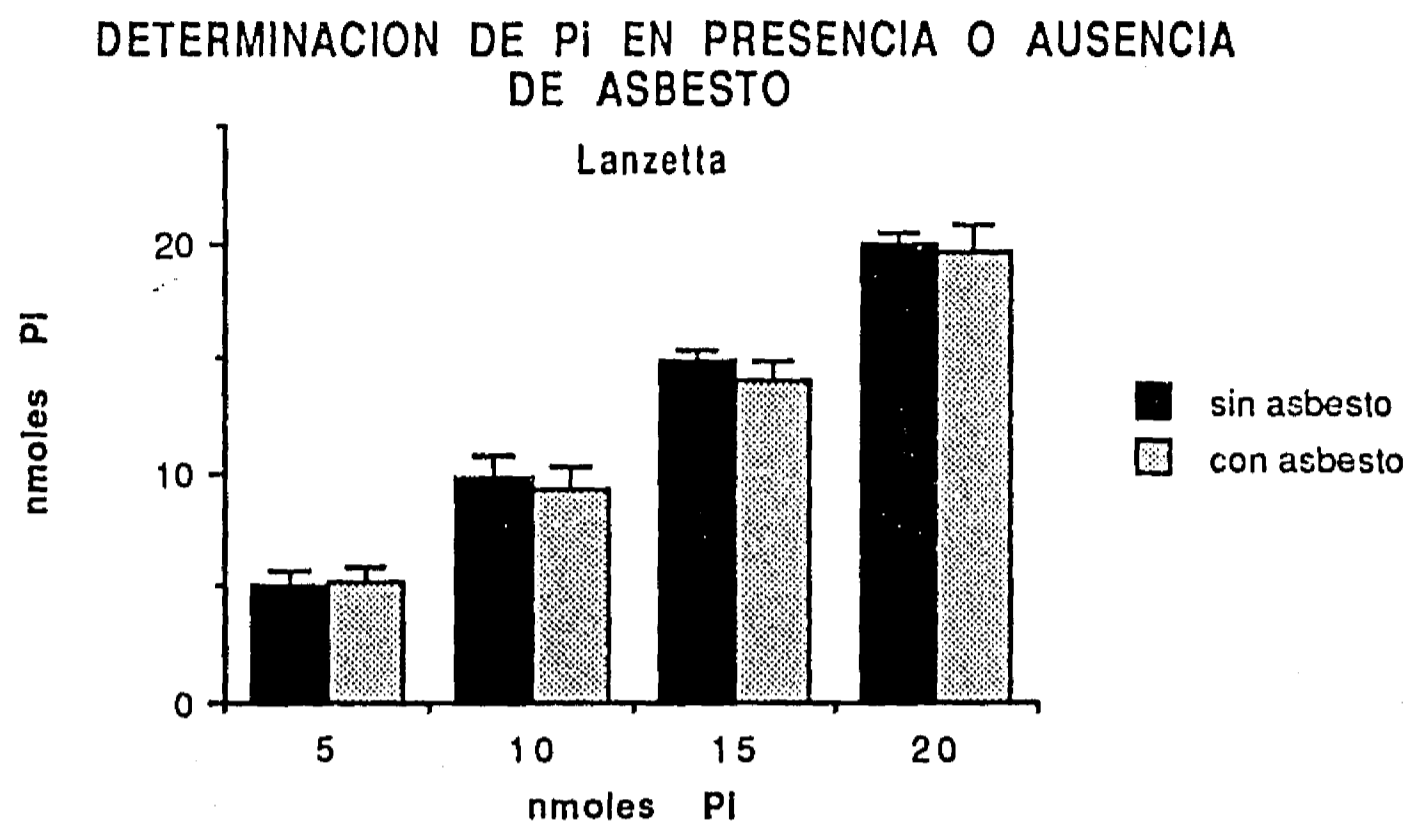


Figura 28. El asbesto (43.12 $\mu\text{g/ml}$) tampoco interfirió con la determinación de P_i por el método de Lanzetta.

CUADRO VIII

MEZCLA DE REACCION CON $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP EN PRESENCIA DE ASBESTO
Diferencia Por ciento

MR ATPasa [Na⁺, K⁺] (3 mM, 7 000 cpm)

asbesto $\mu\text{g/ml}$	2.69	5.39	10.78	21.56	43.12
Total	0	2	3	1	4
Sobrenadante	0	0	0	0	0

MR ATPasa [Ca⁺⁺, Mg⁺⁺] (3 mM, 7 000 cpm)

Total	1	3	4	0	1
Sobrenadante	0	0	0	0	0

Resultados

El empleo de Tritón X-100 produjo aumento del 29% en la actividad de las ATPasas de [Na⁺, K⁺] y del 29.8% en la de [Ca⁺⁺, Mg⁺⁺]. La disponibilidad para liberar ácido siálico de los fantasmas empleando neuraminidasa también se incrementó en 28.8% con el empleo de Tritón X-100. En el caso de las ATPasas, la concentración óptima de Tritón X-100 fue de 0.0125% y en el del ácido siálico de 0.1% (Cuadro IX).

CUADRO IX

ACTIVIDAD ENZIMATICA Y LIBERACION DE ACIDO SIALICO DE FANTASMAS DE ERITROCITOS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE TRITON X-100

Actividad (nmol)	sin /Tritón	con /Tritón	%
ATPasa [Na ⁺ , K ⁺]	98	13.8	29.0
ATPasa [Ca ⁺⁺ , Mg ⁺⁺]	14.8	21.1	29.8
Neuraminidasa	31.3	44.0	28.8

El asbesto produjo inhibición del 50% en la actividad de la ATPasa de [Na⁺, K⁺] (Fig. 29). Este grado de inhibición se alcanzó desde la primera dosis de asbesto ($p < 0.001$). La actividad de los fantasmas control fue de 12.2 ± 1.2 nmol/mg/min. La presencia de ouabaína no produjo diferencias entre el control y los fantasmas con diferentes cantidades de asbesto y la actividad promedio se mantuvo en 4.6 ± 0.4 nmol/mg/min. Cuando los fantasmas control se incubaron con concentraciones crecientes de asbesto, las actividades fueron en general

más bajas. La actividad control fue de 8.7 ± 2.0 nmol/mg/min y no se alcanzó una inhibición importante hasta la última dosis (Fig. 29) ($p < 0.05$). Tampoco se observaron diferencias en presencia de ouabaína (2.9 ± 0.25 nmol/mg/min).

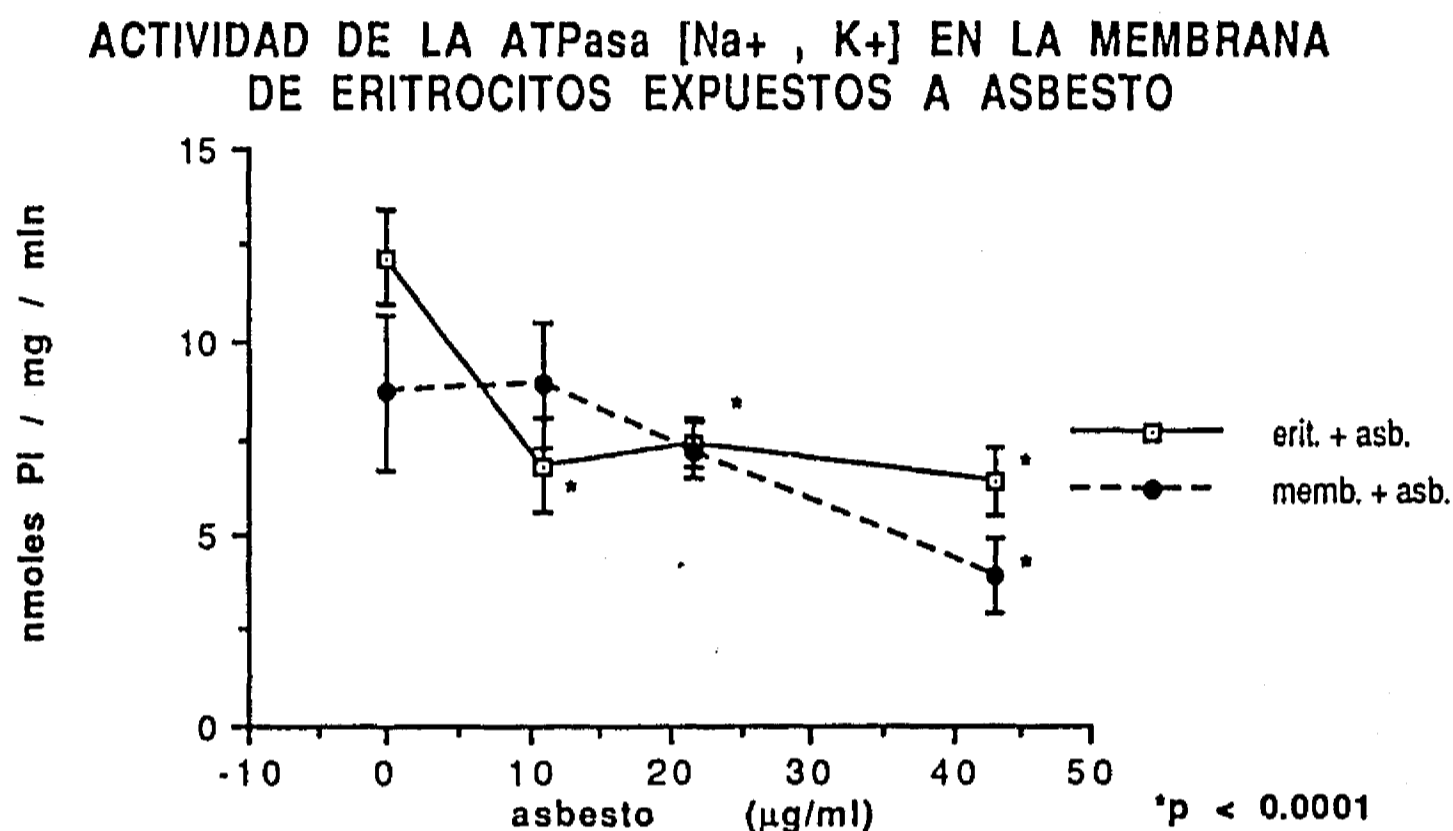


Figura 29. La actividad enzimática de la ATPasa [Na⁺, K⁺] observada en las membranas de eritrocitos expuestos *in vitro* a dosis crecientes de asbesto, resultó en una inhibición significativa a partir de la primera dosis empleada. Por otro lado, la incubación del asbesto con membranas control solo demostró inhibición significativa cuando se emplearon 43.12 µg/ml de asbesto crisotilo.

La actividad de la ATPasa de [Ca⁺⁺, Mg⁺⁺] en los fantasmas de eritrocitos expuestos a asbesto se vió estimulada en relación a la dosis (Fig. 30). Esta alcanzó hasta 57% con la dosis mayor ($p < 0.005$), partiendo de una actividad control de 18.3 ± 1.2 nmol/mg/min. La actividad registrada en ausencia de Ca⁺⁺ se mantuvo en un promedio de 4.0 ± 0.9 nmol/mg/min, a pesar de la presencia de asbesto. En el caso de los fantasmas control incubados con asbesto la actividad

tendió a disminuir en relación a la dosis (n.s.). En estos experimentos las actividades también fueron en general más bajas y la actividad control fue de 14.2 ± 2.5 nmol/mg/min (Fig. 30).

ACTIVIDAD DE LA ATPasa [Ca⁺⁺, Mg⁺⁺] EN LA MEMBRANA DE ERITROCITOS EXPUESTOS A ASBESTO

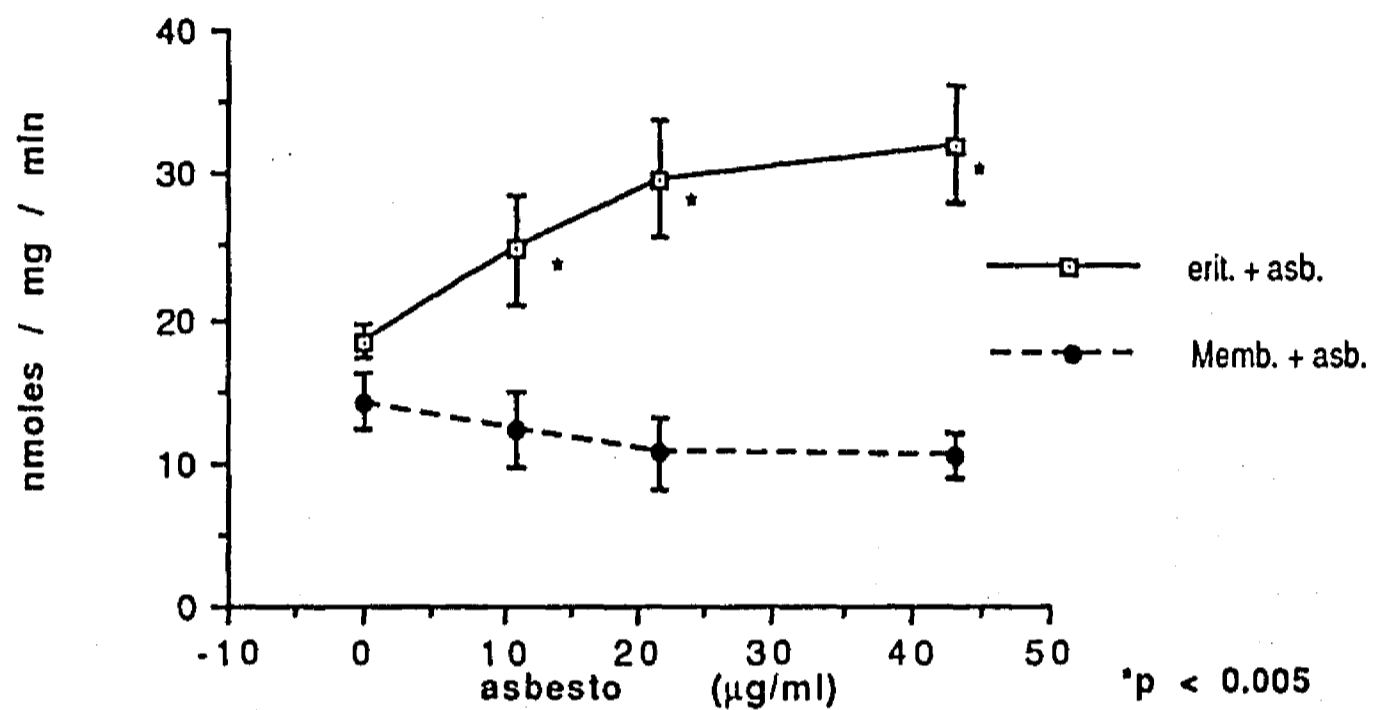


Figura 30. La actividad de la ATPasa [Ca⁺⁺, Mg⁺⁺] en las membranas de eritrocitos previamente expuestos a asbesto, resultó en estimulación progresiva a partir de 10.78 µg/ml. Contrariamente, la exposición de membranas control a asbesto no indujo cambio alguno en la actividad.

Tratamiento con Neuraminidasa:

La exposición de los eritrocitos a asbesto resultó en menor liberación de ácido siálico de los fantasmas tratados con neuraminidasa, sugiriendo que el asbesto es capaz de unirse a los residuos de ácido siálico de la membrana y

Resultados

hacerlos inaccesibles a la enzima. Esto fue más notable cuando se midió el ácido siálico en el sobrenadante de los fantasmas tratados con neuraminidasa, especialmente con los eritrocitos que se expusieron a una dosis de asbesto de 43.12 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.02$). En menor grado se observó tendencia a retener ácido siálico en el botón de asbesto + membranas (Fig. 31) (n.s.). El ácido siálico liberado de 100 μg de fantasmas control fue de 50.9 ± 3.3 nmol.

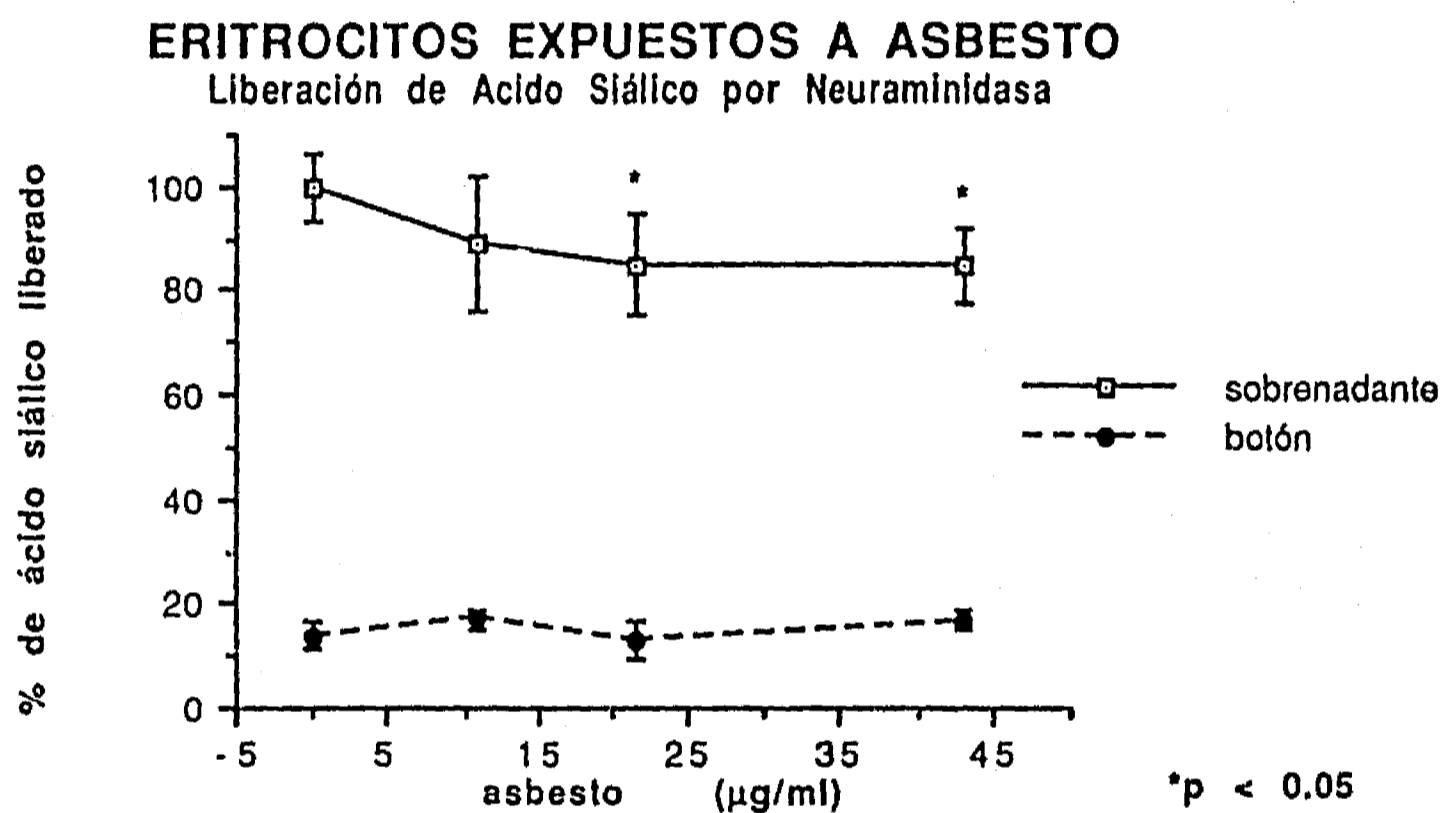


Figura 31. La exposición de eritrocitos humanos a asbesto resultó en una inhibición en la liberación del ácido siálico de la membrana, cuando éstas se incubaron con neuraminidasa. Estos resultados indican una afinidad parcial del asbesto por los residuos de ácido siálico de la membrana de los eritrocitos.

Electroforesis de los Fantasmas de Eritrocitos Expuestos a Asbesto:

El patrón de electroforesis obtenido de los fantasmas control (Fig. 32a) resultó estar compuesto por 10 bandas principales que corresponden a lo

clásicamente descrito para el eritrocito (92, 93) y que consiste (de mayor a menor) de : banda 1, 2, 2.1, 2.2 a 2.6, 3, 4.1 y 4.2, 5, 6 y 7. De éstas, las bandas 1 y 2 corresponden a la espectrina (peso molecular 240 y 220 kDa). La banda 2.1 corresponde a anquirina (peso molecular 200 kDa). Posteriormente existe un número variable de bandas denominadas 2.2 a 2.6 y que corresponden a proteínas asociadas con la anquirina (pesos moleculares <200 kDa). La siguiente banda es la 3, que corresponde al canal de aniones y a una proteína que une anquirina. Aquí también comigran otras proteínas como la ATPasa de $[Ca^{++}, Mg^{++}]$ y glucoproteínas como la ATPasa de $[Na^+, K^+]$ (88) (peso molecular alrededor de 100 kDa). Las bandas 4.1 y 4.2 median la interacción entre la espectrina y la actina (peso molecular de 82 y 76 kDa, respectivamente). La banda 5 corresponde a actina y la 6, a la gliceraldehido-3 fosfato deshidrogenasa (43 y 35 kDa, respectivamnete). El papel de la proteína de la banda 7 no es claro. En ocasiones se observa al final una banda adicional que corresponde a hemoglobina contaminante. Este mismo patrón también se observo en los fantasmas de eritrocitos expuestos a asbesto (43.12 $\mu\text{g/ml}$) (Fig. 32b.) El tratamiento de los fantasmas con Tritón X-100 y el análisis de las fracciones solubilizadas o retenidas en los botones, tampoco demostró diferencias entre los eritrocitos expuestos a asbesto y los observado en los controles (Fig. 32c, d, e, f). Estos resultados cualitativos sugieren que el asbesto se adhiere a la membrana sin "secuestrar" preferencialmente a ninguna proteína. Sin embargo, se requiere de estudios más precisos en los que se cuantifiquen las proporciones de las diferentes proteínas, como se ha informado en otras situaciones patológicas (94, 95).

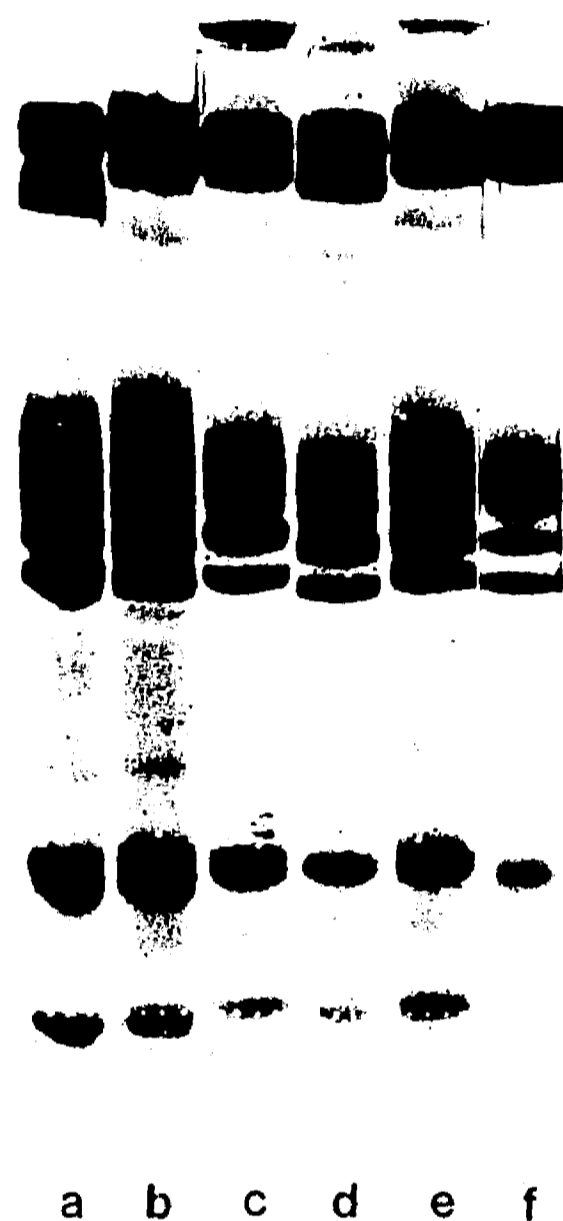


Figura 32. Patrón electroforético de las membranas de eritrocitos control (a) y de eritrocitos expuestos a la dosis mayor de asbesto (43.12 $\mu\text{g/ml}$) (b). El tratamiento de las membranas con Tritón X-100 no produjo diferencias en las bandas observadas en los botones (c) y en los sobrenadantes de eritrocitos control (e), así como tampoco en los de los expuestos a asbesto: botón (d) y sobrenadante (f) (Azul de Coomasie).

Hemólisis en Presencia de Na, K o Li:

No se observaron diferencias en el grado de hemólisis producida en cualquiera de los tres amortiguadores empleados a osmolaridad constante (Fig. 33). Esto indica que la hemólisis inducida por el asbesto no depende de los iones presentes en el medio.

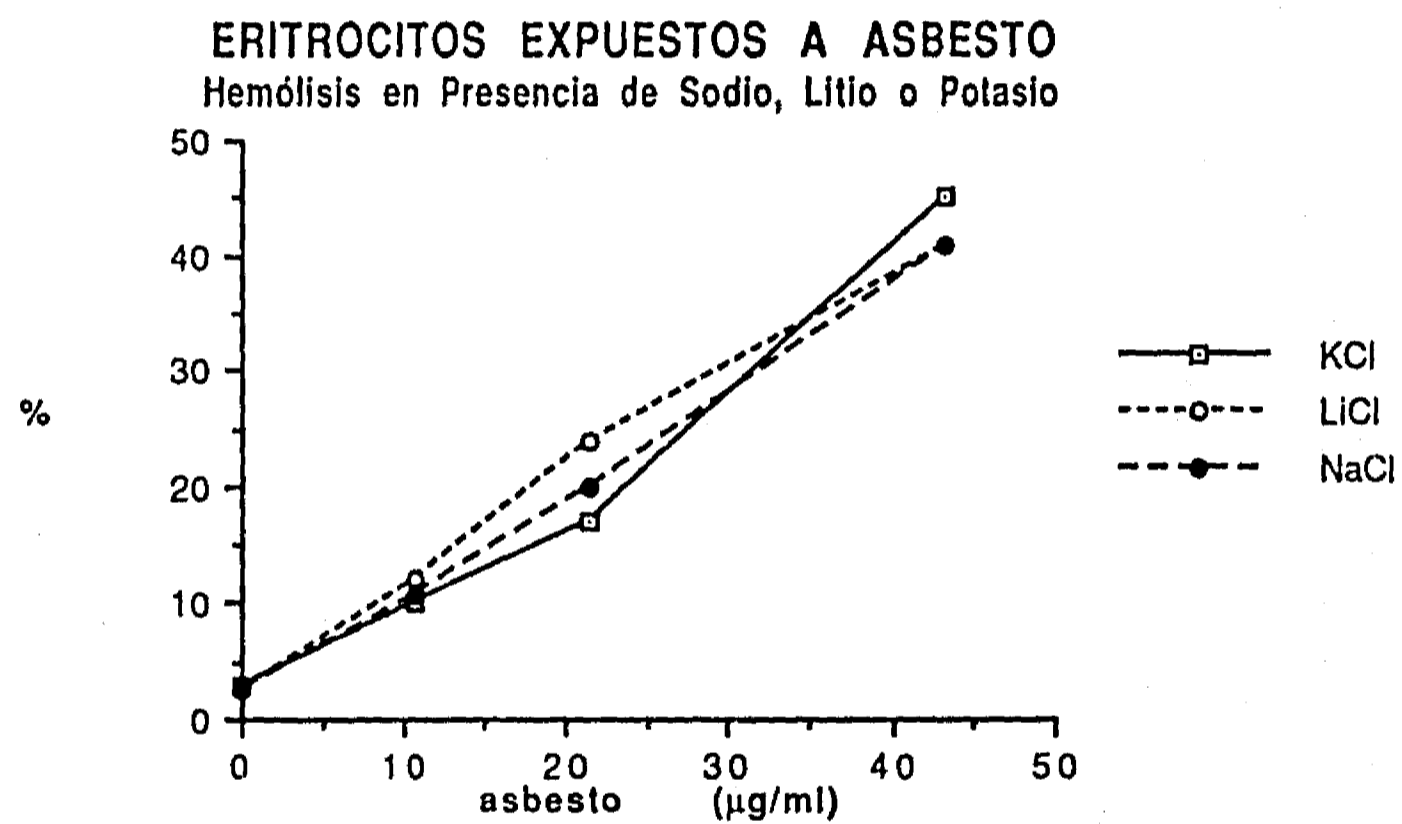


Figura 33. La actividad hemolítica del asbesto es independiente de las cationes (Na^+ , K^+ , Li^+) presentes en el medio de incubación. Esto indica que la inhibición de la ATPasa (Na^+ , K^+) no juega un papel importante en la génesis de la lisis celular inducida por el asbesto crisotilo.

DISCUSION

Lesiones Experimentales por Polvo de Mexicali

En los últimos años nos hemos dedicado a estudiar el potencial tóxico del polvo de Mexicali con la idea inicial de asociar su presencia con la producción de enfermedad intersticial pulmonar (64). Los resultados previamente obtenidos indican que dicho polvo es capaz de producir lisis celular y una lesión intersticial pulmonar multifocal cuando se prueba *in vitro* con eritrocitos y macrófagos alveolares e *in vivo*, cuando se instila en ratas (63, 64, 78, 81, 96). Estos resultados abrieron otra serie de preguntas encaminadas a comprender los mecanismos involucrados en el desarrollo de lesiones inducidas por el polvo. Particularmente este polvo representa un reto ya que su composición lo hace un polvo poco estudiado y además su potencial patógeno se asocia con exposiciones ambientales no ocupacionales.

El polvo de Mexicali es una mezcla de partículas cuya mayoría corresponde a alúmino silicatos (98%) y solamente 2% a sílice cristalino. Esto es relevante ya que en el pasado el desarrollo de enfermedad pulmonar inducida por ciertas partículas se tendía a asociar con el contenido de sílice presente en el polvo inhalado. Recientemente esta tendencia ha cambiado y se ha empezado a identificar el papel de otros compuestos presentes en los polvos como los responsables del efecto patogénico. Esto ocurrió especialmente en aquellas ocupaciones en las que los trabajadores se exponen a mezclas de partículas, como los alfareros (97).

Dentro de los silicatos tóxicos existentes el asbesto es el más ampliamente estudiado. Otros silicatos no fibrosos como el kaolín y la mica (97) también han sido identificados como patógenos. Sin embargo el polvo de Mexicali no corresponde a ninguno de estos compuestos. Cuando se trata del estudio de exposiciones no ocupacionales, las posibilidades se reducen. Hay informes de exposición a fibras de asbesto en poblaciones cuyo suelo es rico en fibras (41), pero lo más relevante para nuestro caso son los informes de exposición a un alúmino silicato en granjeros del sur de California (62). Este tipo de exposición también se documentó en animales del zoológico de San Diego, Cal. y en ambos casos produjo enfermedad intersticial pulmonar. El alúmino silicato identificado correspondió a una mica (moscovita) (62, 98). En el caso del polvo de Mexicali el análisis mineralógico reveló preliminarmente la existencia de alúmino silicatos del tipo de los feldespatos. Esto representa una discrepancia importante, especialmente cuando se trata de muestras obtenidas en dos regiones geográficamente próximas, lo que hace necesario un estudio geológico más detallado de nuestras muestras. Independientemente de esto, la información en cuanto a las lesiones experimentales producidas por alúmino silicatos es pobre, a no ser por lo informado después de las erupciones de Monte Santa Elena en Washington, EE.UU.A. a principios de los años 80. Esta ceniza contiene predominantemente alúmino silicatos del tipo de los feldespatos. Curiosamente estas muestras no producen lesiones en humanos, animales de experimentación o células aisladas (3, 11, 29).

Por estas razones consideramos indispensable continuar con el estudio del polvo de Mexicali y ahondar en la comprensión de los mecanismos iniciales de daño, ya que habíamos probado su capacidad para inducir lesiones pulmonares.

La pregunta inicial se dirigió al estudio del depósito pulmonar de las partículas después de su inhalación y compararlo con lo informado para otras

partículas fibrogénicas (28, 29). Los resultados obtenidos indican que la respuesta inicial a la inhalación del polvo de Mexicali se localiza preferencialmente en la primera bifurcación de los conductos alveolares después del bronquiolo terminal. Veinticuatro horas después el polvo es sustituido por células mononucleares que lo fagocitan y cuya morfología corresponde a la de macrófagos alveolares. La dosis y exposición empleadas no fueron suficientes para producir una lesión morfológica reconocible 30 días después. Esto también es similar a lo observado en ratas expuestas a cuarzo (99) y a asbesto (73). Comparativamente los resultados obtenidos con polvos "inertes", no demuestran consistentemente la existencia de migración celular al sitio de depósito de las partículas, a pesar de que se depositen igual que las fibrogénicas (3, 29, 51).

Estudios previos demostraron que cuando se incubaba *in vitro* suero fresco con asbesto crisotilo este es capaz de activar al sistema de complemento (53, 54). Cuando se demostró la existencia del sistema de complemento en las secreciones pulmonares (52) la hipótesis para explicar la generación de factores quimiotácticos después de la inhalación de asbesto, se hizo evidente. Los estudios de Warheit y col, se encargaron de comprobar el papel del complemento en el reclutamiento celular después de la exposición experimental a asbesto (51, 100).

Cuando realizamos nuestros experimentos ya se sabía que la ceniza del Monte Santa Elena era un alúmino silicato que se depositaba en las bifurcaciones pulmonares pero que era incapaz de atraer macrófagos y de activar complemento *in vitro* (3, 51, 69). Esto hizo particularmente interesante el estudio de la capacidad del polvo de Mexicali para activar complemento y postular la manera en que los macrófagos son atraídos a la primera bifurcación de los conductos alveolares. Nuestros resultados demostraron la existencia de una actividad

quimiotáctica en el suero incubado con polvo de Mexicali, paralela a la activación del complemento sérico. Esta actividad es comparativamente similar a la obtenida con asbesto. Adicionalmente nos propusimos reproducir estos resultados al incubar las partículas con las secreciones pulmonares obtenidas por lavado bronquioalveolar. Los resultados fueron similares, además de probarse que la actividad quimiotáctica se inhibió significativamente en presencia de EDTA y no de EGTA, lo que indica su dependencia de Mg^{++} y sugiere que el complemento es activado por la vía alterna, tal y como fue descrito para el asbesto (53).

Interesantemente el cuarzo y el hierro no activaron al complemento serico; no obstante, el cuarzo fue capaz de activar al complemento presente en las secreciones pulmonares. Nuestra impresión es que el cuarzo pudo haber adsorbido algunas proteínas séricas que previnieron su contacto con las proteínas del complemento, lo que no ocurrió en un ambiente con menor concentración de proteínas como es el lavado bronquial. Hasta el momento no podemos explicar el porque la supresión de Ca^{++} y de Mg^{++} en el sistema no inhiben significativamente la actividad quimiotáctica del lavado incubado con cuarzo. Estas discrepancias sugieren que el cuarzo podría estar ejerciendo sus efectos patogénicos a través de un mecanismo diferente.

Otro punto a señalar es la incapacidad del hierro para activar complemento sérico y que puede estar relacionado con su comportamiento como partícula "inerte". Sin embargo recientemente se han publicado algunos experimentos en los que se menciona la capacidad de estas partículas para activar complemento y para inducir una respuesta celular temprana en el pulmón expuesto (51). Una posible explicación para estas discrepancias podría ser la presencia de endotoxina en las partículas o soluciones empleadas. Nuestros experimentos fueron particularmente "limpios" en cuanto a la existencia de endotoxina, ya que

nunca la encontramos en nuestras soluciones y tomamos la precaución de inactivarla por calor en las partículas empleadas. En el trabajo de Warheit y col. (51) se señala la negatividad para endotoxina en sus ensayos, pero sus partículas no fueron inactivadas por calor. Queda por probar si esta diferencia en el tratamiento de las partículas afecta los resultados obtenidos por ambos grupos.

Vale la pena señalar que las actividades quimiotácticas incluidas en esta tesis corresponden realmente a movimientos contra gradiente, ya que se evaluó la quimiocinesis invirtiendo o igualando los gradientes de las fracciones probadas.

Nuestros resultados ofrecen nuevas pruebas a favor del potencial patógeno del polvo de Mexicali, además de indicar que los mecanismos iniciales involucrados en el desarrollo de la enfermedad son similares a los observados con otros polvos fibrogénicos. La capacidad de las partículas para activar complemento representa el sistema que podría explicar la movilidad celular hacia los sitios de depósito del polvo de Mexicali.

Exposición Múltiple a Asbesto

Los resultados obtenidos de la exposición triple a asbesto representan uno de los primeros esfuerzos para entender la manera como progresan las lesiones pulmonares inducidas por asbesto crisotilo. Particularmente informamos las alteraciones morfológicas observadas por microscopía de luz y de barrido y describimos la producción de una lesión localizada en las paredes de los conductos alveolares. Esta se caracteriza por un engrosamiento de sus paredes por la acumulación de macrófagos alveolares en relación al depósito de fibras a partir de la primera bifurcación. Hasta el momento los modelos estudiados han

centrado su atención en las fases iniciales de la enfermedad (28, 29, 30, 31, 47, 49, 51, 57, 70, 71, 73, 81, 100) o en los efectos tardíos cuando ya se identifica fibrosis intersticial o neoplasias pulmonares (46, 58, 74, 101, 102, 103, 104, 105). Esto, por un lado, permitió relacionar los efectos del asbesto con la producción experimental de la enfermedad y por el otro, con los eventos que los inician. Sin embargo, todavía no se han identificado los factores que median el desarrollo de las lesiones desde el depósito de las fibras, hasta la fase fibrótica de la enfermedad.

Los datos disponibles hasta la fecha permiten proponer al macrófago alveolar como la célula responsable de iniciar y mantener las lesiones, una vez que han sido activados por el contacto con las fibras (106). Aunque en algunos modelos la respuesta celular a la exposición es mixta, polimorfonucleares y macrófagos, los primeros responden temporalmente y los segundos persisten (101). La respuesta macrofágica es más pura en los modelos de exposición por inhalación, en donde los polimorfonucleares nunca se observan (71 y esta tesis). Esto resulta interesante ya que se ha postulado que la atracción celular al sitio donde se depositan las partículas esta mediada por su capacidad para activar complemento (ver sección anterior) y liberar fracciones quimiotácticas como C_{5a} o C_{3a} (49, 51, 100). Se sabe que después de una dosis de asbesto el complemento disponible en las secreciones pulmonares se consume durante las primeras 48 horas y no regresa a niveles normales sino hasta una semana después (100). Por otro lado, en los modelos de exposición crónica se ha visto la persistencia de la respuesta macrofágica, lo que ha sugerido que la migración de estas células es mantenida por algún otro factor quimiotáctico diferente al complemento. Kagan y col. han informado la existencia de varios factores quimiotácticos para macrófagos alveolares producidos *in vitro* por los mismos

macrófagos alveolares obtenidos de ratas crónicamente expuestas a asbesto (46), sugiriendo que la atracción celular no depende totalmente del complemento. Estudios *in vitro* han corroborado la existencia de factores quimiotácticos producidos por macrófagos activados con partículas inorgánicas o productos bacterianos (43, 44, 45, 46).

Otra interrogante de importancia es la manera como se establece la proliferación celular intersticial que lleva a la fibrosis; esta se ha observado aún después de una exposición breve a asbesto (70).

Por un lado se ha mencionado a la lisis celular con la liberación de partículas previamente fagocitadas y de enzimas lisosomales, como el fenómeno central que perpetúa el proceso (7, 72). Recientemente se ha tomado en cuenta la liberación de productos celulares secretados por células vivas y activadas por el contacto con las partículas como un mecanismo que favorece la comunicación intercelular y la inducción de procesos proliferativos y/o secretorios que podrían perpetuar el daño (106). Los datos sugieren que los macrófagos activados con asbesto u otras partículas inorgánicas secretan factores de crecimiento celular como interleucinas 1 y 2 (47, 107), homólogos de PDGF (5) o factores de proliferación fibroblástica (56, 104). Sin embargo, a la fecha no se ha identificado un patrón de secreción que permita diferenciar a aquellos macrófagos activados con partículas fibrogenicas de aquellos con partículas no fibrogénicas, tanto para mediadores de la inflamación como para factores de crecimiento (48, 56, 57, 108). Por lo tanto, aunque la hipótesis de la participación activa del macrófago en la síntesis de los mediadores del daño es atractiva, las pruebas disponibles todavía son incompletas.

De igual manera tampoco se conoce en conjunto el papel de la lisis celular y la persistencia de las fibras en el parénquima pulmonar. Como se puede

observar, el conocimiento del proceso se ha limitado al estudio de la fase inicial o terminal de la enfermedad y todavía no se han estudiado estadios intermedios. Nuestro propósito es obtener datos al respecto y el modelo empleado en esta tesis ofrece una serie de interrogantes importantes. Por un lado observamos que la exposición a dosis subsecuentes de asbesto resulta en mayor penetración y retención de las fibras y por el otro, que se induce una respuesta puramente macrofágica de mayor magnitud y duración, que culmina en una lesión en las vías aéreas menores.

Al parecer este mayor acúmulo de células mononucleares pudiera ser responsable del desarrollo de las lesiones; no obstante, no debe pasarse por alto el hecho de que las fibras permanecen más tiempo en contacto con el epitelio de los conductos alveolares y que estas también pudieran participar en el proceso, alterando cuantitativamente y no necesariamente cualitativamente la respuesta celular. Los estudios morfológicos de los pulmones de ratas expuestas una vez a asbesto también han demostrado que las células epiteliales incorporan timidina tritiada con una mayor frecuencia, sin que se haya identificado el origen y la naturaleza del o los factores responsables (70). Esto desde luego podría ser inducido por algunas monocinas y/o por la acción directa de las fibras de asbesto sobre el epitelio, punto que puede explorarse en nuestro modelo.

Otro aspecto interesante es la respuesta macrofágica observada en los lavados bronquioalveolares, lo que confirma nuestra impresión de que estas células están fundamentalmente involucradas en la enfermedad experimental. La ausencia de aumentos en la cantidad de proteína obtenida por lavado pulmonar (posiblemente indicando que no hay trasudación sérica importante) y la existencia en el lavado de dos fracciones de diferente peso molecular que son quimiotácticas para macrófagos alveolares, sugieren que el complemento no es el único factor

Discusión

que participa en el reclutamiento celular observado. Las fracciones quimiotácticas identificadas siguen un patrón interesante en el que participa un factor entre 10 kDa y 25 kDa durante la fase inicial, seguida por una fase más tardía en la que predomina la fracción >25 kDa. Estos resultados requieren de más trabajo que nos permita identificar la razón por la que las fracciones calentadas a 56°C son más activas que las que no lo fueron. Una posibilidad es que algunos otros componentes del lavado estén interfiriendo con esta actividad, quizás por la participación de algunas enzimas proteolíticas.

Los estudios morfológicos realizados en pulmones de ratas sometidas a lavado pulmonar antes de su fijación, indican que los macrófagos y fibras localizadas en las primeras bifurcaciones se adhieren fuertemente al epitelio en función del tiempo de la exposición. Contrariamente, las células y fibras localizadas en los bronquiolos terminales fueron fácilmente lavadas, lo que sugiere que se encontraban en el proceso de ser eliminadas por el aparato mucociliar. Este punto tiene relevancia para estudios futuros ya que indica que las poblaciones de macrófagos alveolares recuperadas por lavado para estudios *in vitro* no necesariamente representan a las células que participan en la lesión. Por otro lado, la adhesividad aumentada también involucra a las fibras de asbesto, perpetuando los tiempos de exposición y consecuentemente su contacto con las células (109). Queda por determinar la naturaleza de este aumento en la adhesividad celular, el cual podría estar relacionado con activación epitelial y/o macrofágica y en el que participaran algunas monocinas como el factor de necrosis tumoral (110) o los mismos factores quimiotácticos (111), puntos que todavía no han sido explorados. El hecho de que el número de células adheridas al sitio de lesión este aumentado y que el lavado pulmonar no manifieste aumento en el número de células recuperadas, parecería indicar que la exposición a asbesto si resulta en un aumento en el número total de macrófagos que no se

puede determinar únicamente por el lavado bronquioalveolar.

En conclusión, nuestros resultados sientan precedente para continuar el estudio del papel de los macrófagos alveolares en la progresión de las neumoconiosis experimentales, sin olvidar la posible participación del epitelio alveolar. Otro factor que se debe tomar en cuenta es la mayor permanencia de las fibras en los sitios de lesión, lo que también pudiera considerarse como un factor adicional y para lo cual requerimos seguir estudiando este modelo.

Exposición de Eritrocitos a Asbesto

Nuestro tercer objetivo busca conocer la acción de los polvos inorgánicos sobre la porción celular que primariamente se pone en contacto con ellos. Este objetivo tiene una proyección finalista encaminada a conocer los eventos subcelulares que determinan la lisis celular y su activación. Ya hemos señalado que ambos procesos han sido postulados como mecanismos centrales en la génesis de las enfermedades pulmonares producidas por polvos inorgánicos.

El modelo del eritrocito es relativamente simple y permite observar con mayor claridad los resultados; además podría ser el punto de partida para estudios más complicados, que emplearan como modelo a la célula primariamente involucrada en estas enfermedades: el macrófago alveolar.

La lisis celular resultante de la exposición de eritrocitos a asbesto se ha relacionado con diversos factores en donde la interacción partícula célula depende de manera importante de la estructura química y morfología de las fibras; entre ellos Macnab y Harington (2, 36) postularon que la actividad

hemolítica del asbesto depende de su gran contenido de hidróxido de magnesio. Secchi y Rezzonico (112) propusieron a la capacidad del asbesto para adsorber componentes de la membrana celular. Schnitzer y Pudsack (113) propusieron una complicada relación entre el área total de las partículas y su naturaleza química. Posteriormente Morgan y col. (114) y Light y Wei (115) encontraron una relación significativa entre la carga de las partículas y su capacidad hemolítica, al comparar diferentes tipos de asbesto. A partir de la hipótesis de Harington y col. (116), se ha trabajado en torno a la idea de que la carga positiva del asbesto crisotilo impartida por el Mg^{++} , interacciona con los radicales carboxilo del ácido siálico en la superficie celular, conglomerando a las proteínas y aumentando la permeabilidad iónica de la célula. Posteriormente se han agregado otras pruebas que sugieren la existencia de otros factores en el desarrollo de lisis celular, como la peroxidación de los lípidos de la membrana (117), la adsorción de fosfolípidos a las partículas (118, 119, 120), la dependencia del área total de la superficie de las partículas (121) y desde luego, la dependencia del ácido siálico y los fosfolípidos de la membrana (37, 122).

No obstante la información disponible, poco se ha estudiado la función de las membranas afectadas por el asbesto. El único antecedente que pudimos encontrar se refiere a la actividad de algunas enzimas citoplásmicas y de la membrana de eritrocitos expuestos a cuarzo (123) y a asbesto (112). La finalidad de esos estudios fue probar la afinidad del asbesto por las membranas y no por las proteínas citoplásmicas. En el caso del cuarzo también se observó un incremento en la actividad total de las ATPasas, sin que los autores discutieran este fenómeno. Para el caso del asbesto, solo probaron la actividad de la acetilcolinesterasa y fue expresada porcentualmente en relación a la dosis de asbesto empleada, sin que se informaran las actividades específicas de sus

Discusión

controles ni de sus problemas. Es por esto que dichos trabajos solo asocian la actividad enzimática de las membranas con su adsorción a las partículas.

El objetivo de nuestro trabajo fue determinar la actividad específica de las ATPasa de $[Na^+, K^+]$ y de $[Ca^{++}, Mg^{++}]$ en los eritrocitos expuestos *in vitro* a asbesto, esperando encontrar alteraciones en la primera y no en la segunda, por ser esa una glucoproteína y partiendo de la hipótesis de que el asbesto se une predominantemente al ácido siálico de las glucoproteínas de la membrana celular.

Nuestro primer paso fue probar que las suspensiones de asbesto no interferirían con nuestros métodos experimentales. Por un lado, con la determinación de proteína por introducir partículas al sistema y por el otro, por su interacción con los aniones del medio como el ATP o el P_i . Ninguno de estos efectos fue observado, por lo que los resultados indican un efecto directo del asbesto sobre los eritrocitos. Las preparaciones de asbesto corresponden a fibras de un tamaño comparable a las que producirían enfermedad pulmonar al ser inhaladas. Las dosis empleadas incluyen desde las que no producen hemólisis hasta las que lisan 50% de las células expuestas. Los resultados morfológicos corroboraron la interacción de las fibras con las membranas, pasando por una fase de deformación celular previa a la lisis.

De acuerdo con nuestra hipótesis inicial, la actividad de la ATPasa de $[Na^+, K^+]$ se encontró inhibida a partir de una dosis incapaz de producir hemólisis. Esta inhibición no fue dependiente de la dosis. Interesantemente, la incubación del asbesto con los fantasmas obtenidos a partir de células normales no expuestas a asbesto no resultó en una inhibición comparable. Esto puede explicarse en base a la cantidad de membranas que se encuentran orientadas apropiadamente en la preparación de fantasmas (70%), o por el hecho de que algunos componentes de la membrana hayan sido extraídos durante la preparación de los fantasmas o también, por la necesidad de que el eritrocito mantenga su forma para que haya

una óptima interacción con las partículas. Independientemente de estos fenómenos, los resultados indican la existencia de inhibición en la actividad de esta ATPasa como resultado de la interacción del asbesto con las membranas del eritrocito. De manera opuesta, la ATPasa de $[Ca^{++}, Mg^{++}]$ mostró incremento en su actividad dependiente de la dosis de asbesto empleada. Esto no fue observado cuando se incubó el asbesto con los fantasmas normales obtenidos de células no expuestas a asbesto. La explicación de estos cambios requiere de estudios adicionales, sin embargo; la exposición de la célula intacta al asbesto también parece ser determinante en la producción de alteraciones en esta otra ATPasa. Dentro de los factores que estimulan a la ATPasa de $[Ca^{++}, Mg^{++}]$ se encuentran la calmodulina (87), alteraciones en el microambiente lipídico de la enzima (124, 125, 126) o la proteólisis limitada de la misma (126). Todas estas posibilidades tienen cabida teórica en nuestro sistema. Resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio han demostrado la capacidad del asbesto por adsorber calmodulina. Esto podría estar desempeñando algún papel en nuestros experimentos, bien por que la calmodulina se expone artificialmente al asbesto durante la preparación de los fantasmas o bien porque la interacción de las fibras con las membranas impidan que la calmodulina se libere fácilmente durante los lavados hipotónicos. Quedaría por cuantificar comparativamente la cantidad de calmodulina presente en los fantasmas de eritrocitos expuestos o no al asbesto.

La posibilidad de que los lípidos de la membrana alteren el microambiente de la enzima es otra opción viable ya que se sabe que el asbesto induce peroxidación de los lípidos (117) o adsorción de fosfolípidos (119), que podrían resultar en reacomodos o redistribución de lípidos en la membrana. Por último, quedaría por mencionar la posibilidad de que existiera una proteólisis limitada de la enzima, inducida por la liberación de proteasas endógenas, liberadas durante

el proceso y favorecidas por el asbesto. Una manera simple de explorar esta posibilidad podría ser el empleo de inhibidores de proteasas durante la obtención de los fantasmas.

Como se puede observar, las opciones a seguir son varias, pero queda claro que los efectos del abesto sobre estas ATPasas requiere de su interacción con las células intactas. Hasta aquí los resultados parecerían favorecer la idea de que el asbesto interactúa con las glucoproteínas de la membrana, lo que concuerda con nuestros experimentos de disponibilidad del ácido siálico. Sin embargo, la liberación obtenida nunca fue menor del 70%, por lo que la interacción no solo debe de ser a este nivel. Una prueba adicional sería la acción sobre la ATPasa de $[Ca^{++}, Mg^{++}]$ la cual no es una glucoproteína. Resultados informados por otros investigadores tampoco indican una inhibición total en la liberación del ácido siálico de células expuestas a asbesto (37, 122). Esto nos llevó al estudio electroforético de las membranas expuestas o no al asbesto, después de su tratamiento con Tritón X-100 y en los que no observamos diferencias importantes entre las fracciones libres y las adsorbidas a asbesto. Por lo tanto, nosotros favorecemos la idea de que el asbesto atrape fragmentos completos de membrana, sin que comprometa particularmente a alguno de sus componentes. La prueba de que tanto lípidos como proteínas se pegan al asbesto (37, 117, 118, 119, 120, 122) favorece nuestra hipótesis. Quedarían por realizar experimentos más finos de electroforesis en los que se pudieran determinar las relaciones y cantidades de las diferentes proteínas de la membrana, para excluir la posibilidad de que el asbesto se una específicamente a un tipo de proteínas. Por último, las alteraciones funcionales informadas en esta tesis no parecen desempeñar un papel directo en la lisis celular. Los resultados obtenidos en cuanto a incrementos en las concentraciones intracelulares de Na^+

Discusión

en eritrocitos expuestos a asbesto (37), no parecen estar relacionados con la inhibición de la ATPasa de $[Na^+, K^+]$. Sin embargo, esto si podría contribuir en perpetuar un desequilibrio iónico intracelular nocivo para las células. Esta aseveración se basa en el hecho de que la inhibición observada en nuestros experimentos ocurre con dosis que no son capaces de inducir hemólisis. Por otro lado, la incubación de los eritrocitos en ausencia de sodio resulta en grados de hemólisis similares a los observados en su presencia. Un punto interesante a estudiar sería la inducción de cambios similares en un sistema celular más resistente a la lisis inducida por asbesto y en el que los desequilibrios iónicos pudieran desempeñar un papel más importante en la activación celular; el candidato a considerar sería el macrófago alveolar.

En conclusion, nuestros objetivos se cumplieron y permitieron:

- 1) Conocer las fases iniciales de la respuesta pulmonar a un polvo contaminante potencialmente patógeno y relevante en nuestro país.
- 2) Establecer las bases morfológicas de un modelo de exposición múltiple a asbesto que nos permitiera explorar los mecanismos de progresión de la fibrosis intersticial pulmonar inducida por este polvo , y,
- 3) Identificar algunos trastornos en la función de la membrana de eritrocitos expuestos a asbesto, como un proceso relevante en las fases iniciales

de este tipo de enfermedades.

BIBLIOGRAFIA

1. Brain JD y Beck BD: Biassays for mineral dusts and other particulates. En: In Vitro Effects of Mineral Dusts. Editado por Beck EG y Bignon J. Springer-Verlag, NATO-ASI. 1985, 323-336.
2. Macnab G y Harington JS: Hemolytic activity of asbestos and other mineral dusts. Nature. 1967, 214: 522-523.
3. Beck BD, Brain JD y Bohannon DE: The pulmonary toxicity of an ash sample from Mt. St. Helens Volcano. Exp Lung Res. 1981, 2:289-301.
4. Kampschmidt RF, Worthington ML y Mesecher MI: Release of interleukin-1 (IL-1) and IL-1 like factors from rabbit macrophages with silica. J Leukocyte Biol. 1986, 39: 123-132.
5. Kumar RK, Bennett RA y Brody AR: A homologue of platelet-derived growth factor produced by rat alveolar macrophages. FASEB J. 1988, 2: 2272-2277.
6. Hesterberg TW, Oshimura M y Barret JC: Transformation of mammalian cells in culture by asbestos and other mineral dusts: A mechanism involving chromosomal mutation. En: In Vitro Effects of Mineral Dusts. Ed. Beck EG y Bignon J. Springer-Verlag, NATO-ASI. 1985, 185-196.
7. Brain JD: Macrophage damage in relation to the pathogenesis of lung disease. Env Health Persp. 1980, 35: 21-28.
8. Tapp E, Curry A y Anfield C: Sand pneumoconiosis in an Egyptian mummy. Brit Med J. 1975, 2: 276.
9. Ziskind M, Jones RN y Weill H: Silicosis. Am Rev Resp Dis. 1976, 11: 643-665.

Bibliografía

10. Mossman BT y Gee BL: Asbestos-Related Diseases. *N Eng J Med.* 1989, 320: 1721-1730.
11. Buist AS: Are volcanoes hazardous to your health?. What have we learned from Mt. St. Helens?. *West J Med.* 1982, 137: 294-301.
12. Churg A: Lung cancer cell type and asbestos exposure. *JAMA.* 1985, 253: 2984-2985.
13. McDonald JC: Asbestos and lung cancer: Has the case been proven?. *Chest.* 1980, 78: 8374-8376.
14. Wilson RK, Stevens PM, Lovejoy HB y col.: Effects of chronic amorphous silica exposure on sequential pulmonary function. *J Occup Med.* 1979, 21: 399-402.
15. Bennett JG, Dick JA, Kaplan YS y col.: The relationship between coal rank and the prevalence of pneumoconiosis. *Brit J Indust Med.* 1979, 206-210.
16. Rossiter CE: Evidence of dose-response relation in pneumoconiosis. *Trans Soc Occup Med.* 1972, 22: 83-87.
17. FitzGerald MX, Carrington CB y Gaensler EA: Environmental lung disease. *Med Clin North Amer.* 1973, 57: 593-622.
18. Morrow PE: Experimental studies of inhaled materials. A basis for respiratory models. *Arch Int Med.* 1979, 126: 466-470.
19. Knight G y Kirk B: Comparison of respirable dust specifications with recent lung data. *Amer Ind Hyg Ass J.* 1982, 43: 575-579.
20. Morgan WKC, Clague HW y Vinitski S: On paradigms, paradoxes and particles. *Lung.* 1983, 161: 195-206.
21. Tucker AD, Wyatt JH y Underly D: Clearance of inhaled particles from alveoli by normal interstitial drainage pathways. *J Appl Physiol.* 1973, 35: 719-732.

Bibliografía

22. Morrow PE: Lymphatic drainage of the lung in dust clearance. *Ann NY Acad Sci.* 1972, 200: 46-65.
23. Gerrity TR, Garrard CS y Yeates DB: A mathematical model of particle retention in the air spaces of human lungs. *Brit J Indust Med.* 1983, 40: 121-130.
24. Heppleston AG: The pathological anatomy of simple pneumoconiosis in coal workers. *H Pathol Bact.* 1953, 66: 235-246.
25. Kleinerman J, Green F, Harley RA y col.: Pathology standards for coal worker's pneumoconiosis. *Arch Pathol Lab Med.* 1979, 103: 375-432.
26. Churg A y Wright JL: Small airways disease induced by asbestos and nonasbestos mineral dusts. *Chest.* 1984, 85: 536-538.
27. Churg A, Wright JL, Wiggs B y col.: Small airways disease and mineral dust exposure. Prevalence, structure and function. *Am Rev resp Dis.* 1985, 131: 139-143.
28. Brody AR, Warheit DB, Chang LY y col.: Initial deposition pattern of inhaled minerals and consequent events at the alveolar level. *Ann NY Acad Sci.* 1984, 428:108-120.
29. Brody AR y Roe MW: Deposition pattern of inorganic particles at the alveolar level in the lungs of rats and mice. *Am Rev Resp Dis.* 1983, 128: 724-729.
30. Brain JD, Knudson DE, Sorokin SP y Davis MA: Pulmonary distribution of particles given by intratracheal instillation or by aerosols inhalation. *Env Res.* 1976, 11: 13-33.
31. Pritchar JN, Holmes A, Evans JC y col.: The distribution of dust in the rat lung following administration by inhalation and by single intratracheal instillation. *Env Res.* 1985, 36: 268-297.
32. Langer AM y Nolan RP: Physicochemical properties of minerals relevant to biological activities: State of the art. En: *In Vitro Effects of Mineral Dusts.* Ed. Beck EG y Bignon J. NATO-ASI, Springer-Verlag. 1985, 9-24.

Bibliografía

33. Bateman ED, Emerson RJ y Cole P: Mechanisms of fibrogenesis. En: Occupational Lung Diseases. Research approaches and methods. Ed. Weill H y Turner-Warwick M. Marcel-Dekker, New York. 1981, 237-290.
34. Nash T, Allison AC y Harington JC: Physicochemical properties of silica in relation to its toxicity. Nature. 1966, 5033: 259-261.
35. Nolan RP, Langer AM, Harington JS y col.: Quartz hemolysis as related to its surface functionalities. Env Res. 1981, 26: 503-520.
36. Harington JS, Miller K y Macnab G: Hemolysis by asbestos. Env Res. 1971, 4: 95-117.
37. Brody AR, George G y Hill L: Interactions of chrysotile and crocidolite asbestos with red blood cell membranes. Lab Invest. 1983, 49: 468-475.
38. Jaurand MC, Thomassin JH, Baillif P y col.: Chemical and photoelectron spectrometry analysis of the adsorption of phospholipids model membranes and red blood cell membranes to chrysotile fibers. Br J Ind Med. 1980, 37: 169-174.
39. Wagner JC, Berry G y Timbrell V: Mesotheliomas in rats after inoculation with asbestos and other materials. Brit J Cancer. 1973, 28: 173-185.
40. Stanton MF, Layard M, Tegeris A y col.: Relation of particle dimension to carcinogenicity in amphibole asbestos and other fibrous minerals. J Natl Cancer Inst. 1981, 67: 965-975.
41. Harington JS: Fiber carcinogenesis: Epidemiologic observations and the Stanton hypothesis. J Natl Cancer Inst. 1981, 67: 977-989.
42. Lechner JF, Tokiwa T, La Veck M y col.: Asbestos-associated chromosomal changes in human mesothelial cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1985, 82: 3384-3888.
43. Miller K, Calverley A y Kagan E: Evidence of α quartz-induced chemotactic factor for guinea pig alveolar macrophages. Env Res. 1980, 22: 31-39.

Bibliografía

44. Nathan CF, Murray HW y Cohn ZA: The macrophage as an effector cell. *New Engl J Med.* 1980, 303: 622-626.
45. Lugano EM, Dauber JH y Daniele RP: Silica stimulation of chemotactic factor release by guinea pig alveolar macrophages. *J Reticuloendothel Soc.* 1981, 30: 381-390.
46. Kagan E, Oghiso Y y Hatmann DP: Enhanced release of a chemoattractant for alveolar macrophages after asbestos inhalation. *Am Rev Resp Dis.* 1983, 128: 680-687.
47. Kagan E, Georgian MW y Hartmann DP: Enhanced interleukin production and macrophage Ia expression after asbestos inhalation. En: *In Vitro Effects of Mineral Dusts.* Ed. Beck EG y Bignon J. NATO-ASI, Springer-Verlag. 1985, 149-158.
48. Kouzan S, Brody AR, Nettesheim P y Eling T: Production of arachidonic acid metabolites by macrophages exposed in vitro to asbestos, carbonyl iron particles or calcium ionophore. *Am Rev Resp Dis.* 1985, 131: 624-632.
49. Warheit DB, George G, Hill L y col.: Inhaled asbestos activates a complement-dependant chemoattractant for macrophages. *Lab Invest.* 1985, 52: 505-514.
50. Brain JD: Toxicological aspects of alterations of pulmonary macrophage function. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 1986, 547-565.
51. Warheit DB, Overby LH, George G y Brody AR: Pulmonary macrophages are attracted to inhaled particles through complement activation. *Exp Lung Res.* 1988, 14: 51-66.
52. Robertson J, Caldwell JR, Castle JR y Waldman RH: Evidence for the presence of components of the alternative (properdin) pathway of complement activation in respiratory secretions. *J Immunol.* 1976, 117: 900-903.
53. Wilson MR, Gaumer HR y Salvaggio JE: Activation of the alternative complement pathway and generation of chemotactic factors by asbestos. *J Allergy Clin Immunol.* 1977, 60: 218-222.

Bibliografía

54. Saint-Remy JMR y Cole P: Interactions of chrysotile asbestos fibers with the complement system. *Immunology*. 1980, 41: 431-437.
55. Bitterman PB, Rennard SI y Crystal RG: Environmental lung disease and the interstitium. *Chest Med*. 1981, 2: 393-412.
56. Bitterman PB, Wevers MD, Rennard SI, Adelberg S y Crystal RG: Modulation of alveolar macrophage-driven fibroblast proliferation by alternative macrophage mediators. *J Clin Invest*. 1986, 77: 700-708.
57. Sirois P: Cell-derived mediators in relation to asbestos-related tissue injury and fibrogenesis. En: *In Vitro Effects of Mineral Dusts*. Ed. Beck EG y Bignon J. NATO-ASI, Springer-Verlag. 1985, 283-290.
58. Reisser KM, Hesterberg TW, Haschek MW y Last JA: Experimental silicosis. I. Acute effects of intratracheally instilled quartz on collagen metabolism and morphologic characteristics of rat lungs. *Am J Pathol*. 1982, 107: 176-185.
59. Callis AH, Sohnle PG, Mandel GS y col.: Kinetics of inflammatory and fibrotic pulmonary changes in a murine model of silicosis. *J Lab Clin Med*. 1985, 105: 547-553.
60. Kulonen E, Potila M y Vuorio E: Progress in studies on experimental silicosis and in the characterization of the fibrogenic factor. En: *In Vitro Effects of Mineral Dusts*. Ed. Beck EG y Bignon J. NATO-ASI, Springer-Verlag. 1985, 369-376.
61. White R, Janoff A y Godfrey HP: Secretions of alpha-2-macroglobulin by human alveolar macrophages. *Lung*. 1980, 158: 9-14.
62. Sherwin RP, Barman ML y Abraham JL: Silicate pneumoconiosis of farm workers. *Lab Invest*. 1979, 40: 576-582.
63. Yáñez Buruel A: Desarrollo de sistemas *in vitro* que permitan valorar citotoxicidad de partículas contaminantes (polvo). Tesis de Licenciatura. Químico Farmacéutico Biólogo, Facultad de Química, U.N.A.M., México, D.F., 1985.
64. Osornio Vargas AR, Seoane M y Yáñez A: Enfermedad intersticial

Bibliografía

pulmonar asociada con la inhalación no ocupacional de polvos inorgánicos ambientales. *Rev Invest Clin.* 1986, 38: 59-63.

65 Bar-Ziv y Goldberg GM: Simple siliceous pneumoconiosis in Negev bedouins. *Arch Environ Health.* 1974, 29: 121-126.

66. Mitchell RS, Judson FN, Moulding TS y col.: Health effects on urban population. Special considerations of areas at 1 500 m and above. *JAMA.* 1979, 242: 1163-1168.

67. Anderson DO: The effects of air contamination on health. *Canad Med Ass J.* 1967, 97: 528-536; 585-593; 802-806.

68. Osornio Vargas AR: Identificación de partículas contaminantes atmosféricas como patógenos en México. Tesis de Maestría en Ciencias Médicas, Facultad de Medicina, U.N.A.M., México, D.F., 1985.

69. Olenchock SA y Mull JC: Volcanic ash and human complement. *Life Sci.* 1981, 28: 791-794.

70. Brody AR y Overby LH: Incorporation of tritiated thymidine by epithelial and interstitial cells in broncho-alveolar regions of asbestos exposed rats. *Am J Pathol.* 1989, 134: 133-140.

71. Warheit DB, Chang LY, Hill LH y col.: Pulmonary macrophage accumulation and asbestos-induced lesions at sites of fiber deposition. *Am Rev Resp Dis.* 1984, 129: 301-310.

72. Allison AC: Experimental methods. Cell and tissue culture: effects of asbestos particles on macrophages, mesothelial cells and fibroblasts. En: *Biological Effects of Asbestos.* Ed. Bogovski P, Gibson JC, Timbrell V y Wagner JC. Lyon: JARC. 1973, 89-93.

73. Brody AR, Hill LH, Adkins B y col.: Chrysotile asbestos inhalation in rats: deposition pattern and reaction of alveolar epithelium and pulmonary macrophages. *Am Rev Resp Dis.* 1981, 123: 670-679.

74. Timbrell V, Skidmore JW, Hyett AW y Wagner JC: Exposure chambers for inhalation experiments with standard reference samples of asbestos

Bibliografía

of the International Union Against Cancer (IUAC). *Aerosol Sci.* 1970, 1: 215-223.

75. Timbrell V, Hyett AW y Skidmore JW: A simple dispenser for generating dust clouds from standard reference samples of asbestos. *Ann Occup Hyg.* 1968, 11: 273-281.

76. Karnovsky MI: A formaldehyde-glutaraldehyde mixture of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol.* 1965, 27: 137-138.

77. Weinberg JB: Endotoxin contamination and "in vitro" monocyte-macrophage function: methods of detecting, detoxifying, aliminating endotoxin. En: *Methods for Studying Mononuclear Phagocytes.* Ed. Adams DO, Edelson PJ y Koren H. Academic Press Inc, New York, U.S.A., 1981.

78. Hernández Rodríguez NA: Identificación de complemento en secreciones de rata y su activación *in vitro* por polvos inorgánicos. Tesis de Licenciatura, Químico Farmacéutico Biólogo, Fac. Química, U.N.A.M., México, D.F., 1987.

79. Snyderman R: Chemotaxis of human and murine mononuclear phagocytes. En: *Methods for Studying Mononuclear Phagocytes.* Ed. Adams DO, Edelson PJ y Koren H. Academic Press Inc., New York, U.S.A., 1981, 535-547.

80. Meyer M: Complement and complement fixation. En: *Experimental Immunochemistry.* Ed. Kabat EA y Meyer M. 3ª Ed. Charles C. Thomas Publisher, Springfield, Ill., U.S.A., 1958.

81. Armenta Carrillo S: Búsqueda de factores quimiotácticos para macrófagos alveolares en secreción pulmonar de ratas instiladas con asbesto. Tesis de Licenciatura, Biólogo, Fac. Ciencias, U.N.A.M., México, D.F., 1989.

82. Roitt I, Brostoff J y Male D: *Immunology.* Cap. 7 Complemento. Churchill Livingstone, London, 1985, 7-1 - 7-13.

83. Dodge JT, Mitchell C y Hanahan DJ: The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys.* 1963, 110: 119-130.

84. Bradford M: A rapid and sensitive method for the quantitation of

Bibliografía

microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976, 72: 248-254.

85. Steck TL y Kant JA: Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes. Meth Enzymol. 1974, 31: 172-180.

86. Garrahan PJ, Rossi RC y Rega AF: The interaction of K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , and ATP with the [Na, K] ATPase. Ann NY Acad Sci. 1982, 402: 304-328.

87. Carafoli E, Zurim M, Niggli V y Krebs J: The calcium transporting ATPase of erythrocytes. Ann NY Acad Sci. 1982, 402: 304-328.

88. Lanzetta PA, Alvarez LJ, Reinach PS y Candia OA: An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. Anal Biochem. 1979, 100: 95-97.

89. Cassidy JT, Jourdain GW y Roseman S: The sialic acids. VI. Purification and properties of sialidase from *Clostridium perfringens*. J Biol Chem. 1965, 240: 3501-3506.

90. Warren L: The thiobarbituric acid assay of sialic acids. J Biol Chem. 1959, 234: 1971-1975.

91. ZarJH: Biostatistical Analysis. Prentice Hall, Inc. Englewood Cliffs, N.J., 1974.

92. Fairbanks G, Steck TL y Wallach DFH: Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. Biochem. 1971, 10: 2606-2617.

93. Branton D, Cohen CM y Tyler J: Interaction of cytoskeletal proteins of the human erythrocyte membrane. Cell. 1981, 24: 24-32.

94. Tcherina G, Mohandas N y Shohet SB: Deficiency of skeletal membrane protein band 4.1 in homozygous hereditary elliptocytosis. Implications for erythrocyte membrane stability. J Clin Invest. 1981, 68: 454-460.

Bibliografía

95. Agre P, Orringer EP y Bennett V: Deficiency red-cell spectrin in severe, recessively inherited spherocytosis. *N Engl J Med.* 1982, 306: 155-1161.
96. Arenas Huertero F: Inducción *in vitro* de aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos por un silicato no fibroso. Informe de Servicio Social, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, México, D.F., 1988.
97. Silicosis and Silicate Disease Committee: Diseases associated with exposure to silica and nonfibrous silicate minerals. *Arch Pathol Lab Med.* 1988, 112: 673-720.
98. Brambilla Ch, Abraham J, Brambilla E y col.: Comparative pathology of silicate pneumoconiosis. *Am J Pathol.* 1979, 97: 149-163.
99. Brody AR, Roe MW, Evans JN y Davis GS: Deposition and translocation of inhaled silica in rats. Quantification of particle distribution, macrophage participation, and function. *Lab Invest.* 1982, 47: 533-542.
100. Warheit D, Hill LH, George G y Brody AR: Time course of chemotactic factor generation and the corresponding macrophage response to asbestos inhalation. *Am Rev Resp Dis.* 1986, 134: 128-133.
101. Adamson IYR y Bowden DH: Crocidolite-induced pulmonary fibrosis in mice. Cytokinetic and biochemical studies. *Am J Pathol.* 1986, 122: 261-267.
102. Holt PF, Mills J y Young DK: The early effects of chrysotile asbestos dust on the rat lung. *J Pathol Bacteriol.* 1964, 87: 15-23.
103. Wagner JC, Berry G, Skidmore JW y Timbrell V: The effects of the inhalation of asbestos in rats. *Br J Cancer.* 1974, 29: 252-285.
104. Lamaire I, Beaudoin H, Masse S y Grondin CH: Alveolar macrophage stimulation of lung fibroblasts growth in asbestos-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol.* 1986, 122: 205-211.
105. Craighead JE, Akley NJ, Gould LB y Libbus BL: Characteristics of

tumors and tumor cell cultured from experimental asbestos-induced mesotheliomas in rats. *Am J Pathol.* 1987, 129: 448-462.

106. Kagan E: Current issues regarding the pathobiology of asbestosis: A chronological perspective. *J Thorac Imag.* 1988, 3: 1-9.

107. Hartman DP, Georgian M, Ogshio Y y Kagan E: Enhanced interleukin activity following asbestos inhalation. *Clin Exp Immunol.* 1984, 55: 643-650.

108. Nathan CF: Secretory products of macrophages. *J Clin Invest.* 1987, 79: 319-326.

109. Lehnert BE, Valdez YE y Tietjen GL: Alveolar macrophage-particle relationship during lung clearance. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1989, 1: 145-154.

110. Drysdale BE, Agarwal S y Shin HS: Macrophage mediated tumoricidal activity: Mechanisms of activation and cytotoxicity. *Prog Allergy.* 1988, 40: 111-161.

111. Schiffmann E y Gallin JI: Biochemistry of phagocyte chemotaxis. *Curr Top Cell Reg.* 1979, 15: 203-261.

112. Secchi GC y Rezzonico A: Hemolytic activity of asbestos dust. *Med Lav.* 1968, 59: 1-5.

113. Scnitzer RJ y Pudsak FL: Asbestos hemolysis. *Environ Res.* 1970, 3: 1-13.

114. Morgan A, Holmes A y Talbot RJ: The haemolytic activity of some fibrous amphiboles and its relation to their specific surface areas. *Ann Occup Hyg.* 1977, 20: 39-48.

115. Light WG y Wei ET: Surface charge and asbestos toxicity. *Nature.* 1977, 265: 537-539.

116. Harington JS, Allison AC y Badami DV: Mineral fibers: Chemical, physicochemical, and biological properties. *Advan Pharmacol Chemother.* 1975, 12: 291-402.

Bibliografía

117. Gabor S y Anca Z: Effect of asbestos on lipid peroxidation in the red cells. *Br J Ind Med.* 1975, 32: 39-41.
118. Jaurand MC, Magne L y Bignon J: Inhibition by phospholipids of haemolytic action of asbestos. *Br J Ind Med.* 1979, 36: 113-116.
119. Jaurand MC, Thomassin JH, Baillif P y col.: Chemical and photoelectron spectrometry analysis of the adsorption of phospholipid model membranes and red blood cell membranes onto chrysotile fibers. *Brit J Ind Med.* 1980, 37: 169-174.
120. Saat YA, Newman HAI, Hart RW y Allison DK: The effects of asbestos on plasma membrane; surface glycolipids and glycoproteins of syrian hamster embryo cells. *J Environ Pathol Toxicol.* 1980, 4: 435-441.
121. Kaw JL y Waseem M: Surface area of asbestos dusts in relation to hemolysis of mammalian erythrocytes and macrophage adherence. *Ind J Exp Biol.* 1983, 21: 379-382.
122. Jaurand MC, Magne L y Bignon J: Mechanism of haemolysis by chrysotile fibers. *Toxicol Letters.* 1983, 15: 205-211.
123. Secchi GC: Effects of silica dust on some erythrocyte enzymes. *Med Lavoro.* 1967, 58: 412-416.
124. Ronner P, Gazzotti P y Carafoli E: A lipid requirement for (Ca²⁺ + Mg²⁺)-activated ATPase of erythrocyte membranes. *Arch Biochem Biophys.* 1977, 179: 578-583.
125. Taverna RD y Hanahan DJ: Modulation of human erythrocyte Ca²⁺/Mg²⁺ ATPase activity by phospholipase A₂ and proteases. A comparison with calmodulin. *Biochem Biophys Res Comm.* 1980, 94: 652-659.
126. Niggli V, Adunyah ES y Carafoli E: Acidic phospholipids, unsaturated fatty acids and limited proteolysis mimic the effect of calmodulin on the purified erythrocyte Ca²⁺-ATPase. *J Biol Chem.* 1981, 256: 8588-8592.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis alumnos que han colaborado en este proyecto: Angeles Alvarez Pedroza, Adriana Yáñez Buruel, Francisco Arenas Huertero, Norma Hernández Rodríguez y Silvia Armenta Carrillo. Al mismo tiempo a mis maestros y amigos: Dr. Arnold R. Brody, Dr. Edmundo Chávez Cosío, Dr. Jaime Mas Oliva y Dr. Ruy Pérez Montfort. Muy especialmente al Dr. José Antonio Holguín Hueso por su apoyo y enseñanza. A la Sra. Enna Boijseauneau, Srita. María Elena Miranda, Sr. Fernando González y Sr. Florencio Hernández por su ayuda técnica y por último, al Dr. Patrick Coin por haberme iniciado en una nueva dimensión de procesadores de palabras y de gráficas.

RESUMEN

EFFECTOS TISULARES Y CELULARES DE LA EXPOSICION EXPERIMENTAL A POLVOS INORGANICOS

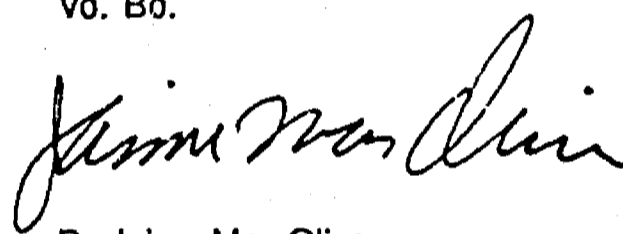
Tesis para Obtener el Grado de Doctor en Investigación Biomédica Básica
Alvaro Román Osornio Vargas

La presente tesis tiene como objetivo valorar a diversos niveles experimentales el potencial y los mecanismos tóxicos inducidos por contaminantes ambientales del tipo de los polvos inorgánicos. La primera parte de la tesis evalúa *in vivo* e *in vitro* algunos de los mecanismos patogénicos de una muestra de polvo ambiental de la ciudad de Mexicali, Baja California (PM). Este polvo es una mezcla de alúmino-silicatos que experimentalmente produce lisis celular y fibrosis pulmonar y que al ser inhalado por ratas (3 hrs., 14 mg/m³ de aire) se deposita principalmente en la primera bifurcación de los ductos alveolares. Veinticuatro horas después de la inhalación, las partículas fueron removidas y sustituidas por cúmulos de macrófagos alveolares (MA) que migraron a los sitios de depósito del polvo. Dado que el PM fue capaz de activar *in vitro* el complemento presente en el suero y en las proteínas del árbol traqueobronquial (activación que resultó en quimiotaxis de MA) se postula que la migración de MA observada *in vivo* pudiera deberse a activación del complemento. Este patrón de respuesta es muy similar al inducido por otros polvos tóxicos como el asb^o y el cuarzo, por lo que como segundo objetivo nos propusimos valorar la respuesta a la inhalación de un contaminante mejor caracterizado como es el asbesto. La inhalación de tres dosis de asbesto resultó en una lesión fibrótica, histológicamente reconocible a lo largo de los conductos alveolares, ocho días después de la última inhalación. Las observaciones a tiempos post-exposición mas tempranos, indican que el polvo se sigue depositando en la primera bifurcación y que el número de MA que migra a esos sitios es mayor. Las células, al ponerse en contacto con el asbesto, se adhieren al epitelio y no pueden ser removidas por lavados bronquioalveolares. Estos resultados indican que el MA juega un papel central en la progresión de las lesiones pulmonares inducidas por polvos inorgánicos. Por último, el tercer objetivo se encaminó a determinar el efecto del asbesto crisotilo en la función de la membrana del eritrocito expuesto *in vitro*. Específicamente se valoró la actividad de la ATPasa de [Na⁺, K⁺] y de [Ca⁺⁺, Mg⁺⁺], encontrándose una inhibición de la primera y una estimulación de la segunda. Aunque estos hallazgos no explican el potencial hemolítico del asbesto, sí ofrecen información importante que permitirá comprender mejor los

mecanismos de daño observado en células que naturalmente se exponen a este tipo de contaminantes (p.ej. MA).

En conclusión, la presente tesis ofrece información relacionada con las fases iniciales de la interacción *in vitro* e *in vivo*, de partículas inorgánicas con células aisladas y con el pulmón. Las muestras estudiadas correspondieron a un polvo contaminante relevante a nuestro medio y al asbesto, un tipo de partícula de características bien conocidas. Las metodologías empleadas fueron: microscopia de luz y de barrido, microanálisis de rayos-x, exposición de animales a polvos inorgánicos, determinación del complemento, quimiotaxis, doble inmunodifusión, aislamiento de proteínas, determinaciones enzimáticas y electroforesis.

Vo. Bo.



Dr. Jaime Mas Oliva

Tutor

ABSTRACT

Inhalation of inorganic particles results in interstitial lung disease. The current hypothesis states that alveolar macrophages (AM) play a central role in the disease by moving towards the inhaled particles, subsequently becoming activated and then secreting several molecules that lead to a fibrotic lung disease. This thesis deals with the pathogenesis of interstitial lung disease at three different levels: 1) recognition of early particle deposition and consequent cell response to an aluminum-silicate previously identified as a pollutant by our group, 2) identification of the deposition pattern and the AM response to a triple exposure to chrysotile asbestos, and 3) the study of membrane functional alterations in red blood cells exposed to asbestos, as an indicator of early changes induced by particles. These studies were based on morphological observations at the light and electron microscopic level, as well as chemotaxis and biochemical evaluations of membrane ATPases. Our results demonstrate that the aluminum-silicate from Mexicali, Baja California, deposits in the lung and induces a cell response after inhalation in rats. Similar results have been observed with other fibrogenic dusts. We also demonstrate the capability of this dust to activate complement, suggesting that the AM accumulation occurring at sites of particle deposition could be mediated by this system. In addition, multiple exposures to asbestos result in a severe lesion along the alveolar ducts. These lesions are related to deeper particle deposition and to a greater AM mobilization. Finally, we demonstrate that red blood cells exposed in vitro to asbestos alter their shape before being destroyed. Previously to lysis, $[Na^+, K^+]$ ATPase is inhibited and the $[Ca^{++}, Mg^{++}]$ ATPase is stimulated. At the present time we are in the process of studying the relevance of such observations.

Our results permitted the identification of the early biological and biochemical events produced by the inhalation of a local air pollutant. We also described for the first time, the particle deposition pattern and AM response in rats exposed three times to asbestos. Finally, our membrane studies open a new area of study directed to understand the cell alterations induced by inorganic particles.

Vo. Bo.



Dr. Jaime Mas Oliva, Tutor

ENVIRONMENTAL RESEARCH

Associate Editors

E. BAKER
D.V. BATES
T.W. CLARKSON
D. HOEL
B. HOLMBERG
R. LAUWERYS
R. LILIS
C. MALTONI
M.A. MEHLMAN
H. NEEDLEMAN
G.S. OMFENN
D.P. RALL
E.K. SILBERGELD
Y. SUZUKI
K. TSUCHIYA
W. WANG

Advisory Editors

D.B. BAKER
I. BIGNON
M.-N. CHENG
M.R. CULLEN
E.J. DESERRES
D. DJURIC
A. ENGLUND
A.L. FRANK
L. FRIBERG
A. GARRO
J. GODBOLD
I.R. GOLDSMITH
P. GRANDJEAN
J.P. GREEN
P. GUZELIAN
W. HALPERIN
S. HERNBERG
R.J. JACKSON
K.H. KILBURN
R.E. LETZ
K. MAHAFFEY
A. MARCUS
J.M. MELIUS
A. MILLER
N. NELSON
W.J. NICHOLSON
S.F. NORDBERG
T. NORSETH
M. PISCATOR
C. RAPPE
W.J. ROGAN
L. ROSENSTOCK
S. SASSA
H. SEIDMAN
S.S. SPENCER
W.G. THILLY
L. TOMATIS
A.C. UPTON
E.C. VIGLIANI

Editor-In-Chief: PHILIP J. LANDRIGAN
Senior Consulting Editor: IRVING J. SELIKOFF
Managing Editor: JOSÉ A. VALCIUKAS

Division of Environmental and Occupational Medicine
Mount Sinai School of Medicine
One Gustave Levy Place, Box 1057
New York, New York 10029
(212) 241-6173

May 30, 1991

Dr. Alvaro R. Osornio-Vargas
Division de Investigacion Basica
Instituto Nacional de Cancerologia
Ave. San Fernando No. 22
Tlalpan, Mexico, D.F., 14000
Mexico

RE: 90-116

Dear Dr. Osornio-Vargas:

We are pleased to write that your paper, "Experimentally induced lung cell toxicity by a mixed dust from Mexicali, Baja California, Mexico" has been accepted for publication in *Environmental Research*. The tentative publishing date is August 1991.

You will be hearing from our publishers, Academic Press, with page proofs. Please sign the enclosed copyright form and send it directly to them at the address shown in the bottom of the form.

We look forward to seeing the manuscript in our Journal.

Sincerely yours,



José A. Valciukas, Ph.D.
Managing Editor

JAV/kg
encl.

PUBLISHER

ACADEMIC PRESS INC
Harcourt Brace Jovanovich Building
1250 Sixth Avenue
San Diego, California 92101